

# **ISCHAEMIA OKOZTA FUNKCIONÁLIS ÉS MORFOLÓGIAI KÁROSODÁSOK VALAMINT NÉHÁNY LEHETSÉGES NEUROPROTEKTÍV BEAVATKOZÁS VIZSGÁLATA PATKÁNY MODELLEN**

**Ph.D. értekezés**

**Marosi Máté Gábor**

Témavezető:

Dr. Farkas Tamás

egyetemi docens

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR

BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

ÉLETTANI, SZERVEZETTANI ÉS IDEGTUDOMÁNYI TANSZÉK

2009.

SZEGED

## **Tartalomjegyzék:**

<b>Rövidítések jegyzéke:</b>	3
<b>Bevezetés:</b>	4
<b>Az agyat érintő ichaemiás állapotok:</b>	4
<b>A hosszútávú szinaptikus aktiválódás:</b>	10
<b>Lehetséges neuroprotektív stratégiák:</b>	13
<b>A kinureninek:</b>	17
<b>A glutamát scavenging lehetősége:</b>	20
<b>Állatkísérletes modellek az agyi hipoperfúzióra/ischaemiára:</b>	24
<b>Célkitűzés:</b>	26
<b>Anyagok és módszerek:</b>	27
<i>Állatok:</i>	27
<i>Ér okklúzió:</i>	27
<i>In vitro elektrofiziológia:</i>	29
<i>Szövetten:</i>	31
<i>Hatóanyag-beadás:</i>	34
<i>Alkalmazott statisztikai módszerek:</i>	34
<b>Eredmények:</b>	36
<b>4VO kísérletsorozat eredményei:</b>	36
<b>Hisztológia:</b>	36
<i>In vitro elektrofiziológia:</i>	39
<b>2VO kísérletsorozat eredményei:</b>	42
<b>Hisztológiai vizsgálat:</b>	42
<b>Elektrofiziológia:</b>	43
<b>Az alapvető szinaptikus jeltovábbítás vizsgálata:</b>	43
<b>A preszinaptikus transzmitter-felszabadulás vizsgálata:</b>	43
<b>Az LTP kiválthatóság vizsgálat:</b>	44
<b>Megbeszélés:</b>	48
<b>Összefoglaló:</b>	54
<b>Summary:</b>	57
<b>Köszönetnyilvánítás:</b>	60
<b>Irodalomjegyzék:</b>	61
<b>Tudományos közlemények jegyzéke:</b>	73
<b>Mellékletek:</b>	76

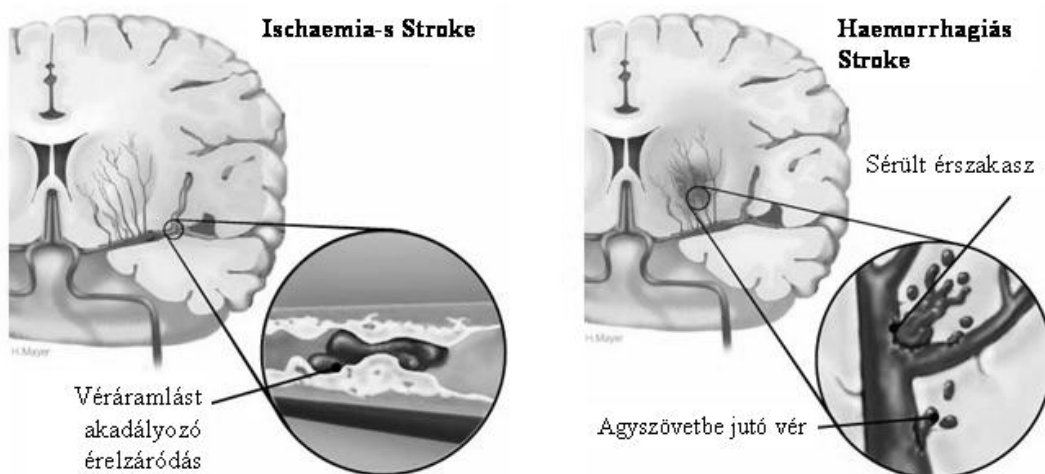
## Rövidítések jegyzéke:

2VO: a két arteria carotis communis leztorítása (two vessel occlusion)  
3-HAO: 3-hidroxiantranilsav oxidáz;  
4VO: 4 ér elzárás - a két arteria carotis communis és a két arteria vertebralis elzárása (four-vessel occlusion)  
5-HT: 5-hidroxitriptamin  
aCSF: mesterséges agy-gerincvelői folyadék (artificial cerebrospinal fluid)  
AHA: Amerikai Szív Egyesület (American Heart Association)  
ALS: amyotrophias lateral sclerosis  
AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-methylisoxasole-4-propionát  
BBB: vér-agy gát (blood-brain barrier)  
CA1: Cornum Ammon 1-es régió  
CA3: Cornum Ammon 3-es régió  
CCA: arteria carotis comunis (common carotid artery)  
CPR: cardiopulmonáris újraélesztés (cardiopulmonary resurection)  
CREB: cAMP respond element binding  
CSF: cerebrospinális folyadék  
EAAT: excitatórikus aminosav transzporterek (axcitatory aminoacid transporter)  
ec: extracelluláris  
EPSP: serkentő posztszinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potencial)  
fEPSP: mező-serkentő posztszinaptikus potenciál (excitatory postsynaptic potencial)  
FJ-B: Fluoro-JadeB  
GABA: gamma-amino-vajsav (gamma-aminobutyric acid)  
GF: növekedési faktor (growth factor)  
Glu: glutamát  
GOT: glutamát-oxáletecetsav transzamináz  
HFS: nagy frekvenciás ingerlés (High Frequency Stimulation)  
ic: intracelluláris;  
IDO: indoleamin 2,3-dioxigenáz  
IO: bemenet/kimenet (input/output)  
IPI: impulzusok közti időtartam (interpulse intervals)  
ISF: intersticiális folyadék (interstitial fluid)  
ISI: ingerlések közötti idő intervallum (interstimulus interval)  
KAT: kinurénsav-transzamináz  
KYNA: kinurénsav (kynurenic-acid)  
L-KYN: L-kinurenin (L-Kynurenine)  
LTP: a szinaptikus áttevődés tartós megnövekedése (long-term potentiation)  
MAO: monoamin oxidáz  
NeuN: neuronális magi antitest (anti-neuronal nuclei)  
NMDA: N-metil-D-aszpartát  
NOS: nitrogén-monoxid-szintetáz  
OxAc: oxálecetsav (oxaloacetate)  
PKA/C: Protein Kináz A/Protein Kináz C  
PPF: páros impulzus facilitáció (paired pulse facilitation)  
PROB: probenecid  
QPRT: kvinolénsav foszforibosil transzferáz  
SC: álműtött (sham control)  
TDO: triptofán 2,3-dioxigenáz  
TIA: transient ischaemic attack

## Bevezetés:

### Az agyat érintő ichaemiás állapotok:

A fejlett, iparosodott országokban a szív, érrendszeri és a daganatos megbetegedések valamint ezek következményei jelentik a leggyakoribb halálozási okot. A cerebrovasculáris betegségek során az agyban a leggyakrabban ischaemiás állapot jön létre. Az emberi agy normál működéséhez szükség van a szívből kiáramló vér egynegyedére; ha a vérellátás mértéke valamilyen oknál fogva lecsökken, akkor az érintett agyi terület energia és oxigén ellátása is lecsökken, és kialakul a fent említett ischaemiás állapot. A vérellátás zavarának helyétől, mértékétől és időtartamától függően helyi, vagy generalizálódó agyi funkciókiesés alakulhat ki (National Audit Office, 2005; Sauerbeck, 2006). Ha a véráramlás rövid időn belül helyreáll, akkor átmeneti ischaemiás eseményről (transient ischaemic attack, TIA) beszélünk. Az agyi vérkeringést érintő problémák, agyérkatasztrófák közül a legnagyobb számban azok az esetek fordulnak elő, amelyekben az agy valamely érében történik a véráramlást akadályozó esemény. Az ilyen esetek 80-85%-a az ún. ischaemiás stroke (Sudlow és Warlow, 1997; Rosamond és mtsai., 2007), a fennmaradó 15-20% az úgynevezett vérzéses, vagy hemorraghiás stroke (Kidwell és Warach, 2003) (1. ábra).



**1. ábra Az agyérkatasztrófák típusai és keletkezésük okai**

[http://doctor2008.files.wordpress.com/2009/02/stroke\\_hemorrhage1.jpg](http://doctor2008.files.wordpress.com/2009/02/stroke_hemorrhage1.jpg);

[http://doctor2008.files.wordpress.com/2009/02/stroke\\_ischemia.jpg](http://doctor2008.files.wordpress.com/2009/02/stroke_ischemia.jpg)

A stroke az egyik vezető halálok az Egyesült Államokban is (White és mtsai., 2000), ahol évente kb. 700.000 ember szenved el új, vagy visszatérő stroke-ot. Európában évente közel

650.000 haláleset történik stroke miatt, ugyanez a statisztika Angliában 110.000 stroke-os esetet mutat évente (National Audit Office, 2005).

A kedvezőtlen mortalitási mutatók és a stroke közvetlen következményein túl további problémát jelent, hogy az átmeneti vagy tartós vérellátási zavarok hatására neurológiai és pszichiátriai betegségek alakulhatnak ki. Ez az állapot egyik kiváltó oka lehet a degeneratív dementiák kialakulásának is (Zlokovic, 2005). Egy tipikus ischaemiás stroke következményei számokban kifejezve: 32.000 neuron, 230 millió szinapszis és 200 m mielin-hüvellyel borított idegsejt nyúlvány veszik el másodpercenként az érintett agyterületen, amely becslések szerint megfelel 36 év alatt történő normál öregedés során kialakuló változásnak (Saver, 2006).

A stroke-on átesett páciensek hatalmas terhet rónak a társadalomra, a betegellátó rendszerre és az érintettek családjára is. Amerikában az ischaemiás stroke következményei miatt jelenleg hárommillió tartósan munkaképtelen személy van, a stroke túlélők 31%-a segítségre szorul az önellátáshoz, 20%-uk képtelen segítség nélkül járni. 1998-ban a stroke direkt és indirekt költségei az USA-ban elérték a 43,3 milliárd dollárt (White és mtsai., 2000). A cerebrovasculáris betegségek kezelésének költsége a 25 Európai Unió tagállamra vonatkozóan 21 milliárd euró volt 2003-ban (Leal és mtsai., 2006). Egy példa: Angliában és Wales-ben a stroke-os betegek által kórházban eltöltött napok száma összességében eléri a 2,6 millió napot évente (National Audit Office, 2005).

Fontos megemlíteni, hogy az agyi vérellátás zavara nem csak agyérkátsztrófa során alakulhat ki. Számos baleset vagy betegség során kialakuló szívmegállás következményeként is megszűnik a teljes agy vérellátása. Érthető tehát, hogy szívmegállás után miért fontos a minél hamarabbi újraélesztés és a spontán keringés visszaállítása. Évente az összes újraélesztések száma Észak-Amerikában és Európában is megközelíti az 500.000-et (Bottiger és mtsai., 1999; Peberdy és mtsai., 2003; Eckstein és mtsai., 2005). Az USA-ban évente körülbelül 70.000 esetben kell újraélesztést alkalmazni szívinfarktus esetén. Ugyanitt a kórházon kívül szívinfarktus következményében történt szívmegálláson átesett páciensek 2-15%-a hagyta el élve a kórházat (Laver és mtsai., 2004). Az újraélesztést követő halálozások legfőbb oka az agyat ért kiterjedt idegi sérülés, amely a szívmegállás következtében kialakuló globális agyi ischaemia eredménye (Krause és mtsai., 1986; Laver és mtsai., 2004). Az újraélesztésen átesett és életben maradt személyek 40-50%-a tartós kognitív-funkció károsodást szenvedett, úgymint memória kiesést, összpontosítási képesség romlást (Lim és mtsai., 2004; van Alem és mtsai., 2004). Ezen személyek csupán 3–10%-a volt képes teljes mértékben visszatérni előző életviteléhez

(Krause és mtsai., 1986). Számos módszert alkalmaznak a cardiopulmonáris újraélesztés (cardiopulmonary resuscitation, CPR) érdekében – ez pedig maga után vonja a cerebrális „újraélesztést” is – ám teljes szívmegállás után az agyi funkciók visszaállítására és megvédésére a klinikumban nagyon csekélyek a lehetőségek.

A szívmegállás globális agyi ischaemiát eredményez, és az agy extrém érzékenységet mutat az ischaemiás állapotokra. Jó példa erre az, hogy 5-6 másodperces ischaemia esetén a páciens elveszti eszméletét (Rossen és mtsai., 1943). Az agyban az oxigén tenzió két perc alatt 0-ra csökken a normális keringés nélkül (Cavus és mtsai., 2006).

Átmeneti, globális agyi ischaemia (pl.: szívmegállás) okozta agysérülés és a regionális (nem teljes) agyi ischaemia (pl.: ischaemiás stroke) számos esetben oka lehet neurológiai elváltozásoknak, egyes esetekben a páciens tartós rokkantságának vagy halálának.

Világszerte széles körben folynak kutatások a stroke és egyéb agyi vérkeringési zavarok (például krónikus agyi hipoperfúzió) megelőzésére, illetve annak akut ellátására és a rehabilitáció teendőire vonatkozóan. Az elmúlt években, évtizedekben a hypoxiás agykárosodás mechanizmusát egyre mélyebben sikerült megismerni, és ennek hatására mind a prevencióban, mind a terápiában ígéretes eredmények születtek. A sokrétű vizsgálatokból kiderült, hogy az idegsejtek károsodásának és pusztulásának megakadályozása, illetve a neurológiai károsodások mérséklése komplex feladat, amely egy támadásponton hatva valószínűleg nem oldható meg. További igény mutatkozik a klinikumban is alkalmazható alternatív neuroprotektív stratégiák kidolgozására és új hatóanyagok kipróbálására.

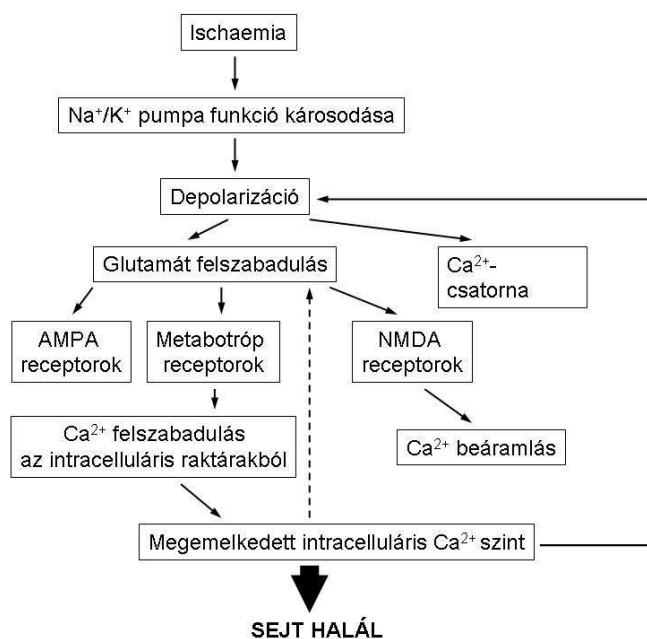
A stroke kezelésében a múlt század 90-es éveinek közepétől jelentős szemléletváltozás következett be. Jól példázza a korábbi helyzetet az Amerikai Szív Társaság (American Heart Association; AHA) Stroke Tanácsának 1994-es iránymutatása (Adams és mtsai., 1994), amely a trombolízist nem tartotta megalapozottnak, pedig máig az egyetlen hatásos stroke-kezelés a klinikumban (Lyden, 1999), ugyanakkor a neuroprotekcióna és a neurológiai-funkció javítására vonatkozóan nem tett javaslatot. A kilencvenes évektől kezdődően ezt a nézetet felváltotta egy jóval optimistább szemlélet, amiben szerepe lehet annak is, hogy a fokális agyi ischaemia patomechanizmusát illetően is rohamosan bővültek ismereteink (Farkas és mtsai., 2002; Sarti és mtsai., 2002; Farkas és mtsai., 2004; Zlokovic, 2005). Az eufórikus hangulatot a humán gyógyszereszek – klinikai vizsgálatok – kudarcairól egyre sűrűbben érkező híradások törték le, s napjainkra

már-már kétségesse vált a humán stroke utáni neuroprotektív kezelés lehetősége. A krónikus agyi keringési zavarok nehezen definiálható tünetegyüttesét az agyi keringés hosszan tartó elégtelensége következtében kialakuló kóros morfológiai és biokémiai elváltozások hozzák létre. A hosszantartó csökkent agyi vérellátás nemcsak cerebrovasculáris károsodás által okoz neurológiai deficitet, hanem a megzavart kalcium-homeosztázis révén kulcsszerepet játszik számos kórfolyamat, mint például az epilepszia, a Huntington-kór, az amyotrophias lateral sclerosis (ALS), az Alzheimer-kór stb. során észlelt patológiás, neurodegeneratív elváltozások kialakításában is (Celsis és mtsai., 1987; Yoshida és mtsai., 1988; Leigh és Meldrum, 1996; de la Torre, 1999; Karhunen és mtsai., 2005). A központi idegrendszer sejtjei energiaháztartásuk fenntartása érdekében a fő szubsztrátokból (oxigén, glükóz, ATP stb.) állandó ellátást igényelnek. Kismértékben csökkent áramlás (low flow) egészséges agyszövetben sem funkcionális, sem morfológiai változást nem okoz, mert a csökkent oxigénkínálat még kompenzálható. Egy bizonyos áramlási érték (funkcionális küszöb) alatt azonban a szubsztrátellátás elégtelenné válik, egyes sejtfunkciók, elsősorban a neuronok működése károsodhat, ami elektrofiziológiai módszerekkel már detektálható. Az okozott neurológiai deficit mértéke a perfúzió-csökkenés mértékével egyenesen arányos (Jones és mtsai., 1981). A funkció-károsodás egy határig reverzibilis, egy áramlási érték alatt (irreverzibilis áramlási küszöb) azonban olyan mértékűvé válik, ami visszafordíthatatlan membránkárosodást és egyéb morfológiai elváltozást, végül a neuronok pusztulását eredményezi. A sejtek funkcionális károsodása azonnal jelentkezik, ha a véráramlás a funkcionális küszöb alá csökken, míg az irreverzibilis morfológiai károsodás kialakulásához hosszabb idő kell.

Az áramláscsökkenés bizonyos mértékénél az agyi sejtek ATP szintjének csökkenése figyelhető meg, ami magyarázható a sejtek megváltozott glükóz metabolizmusával. Kimutatható, hogy a krónikus ischaemia jelentősen károsítja a vér-agy gát (blood-brain barrier, BBB) glükóztranszporter kinetikáját is, ezáltal csökken a glükózkínálat a neuronok és gliák számára (Suzuki és mtsai., 1998). A krónikusan fennálló lokális hypoxia károsodott glükózmetabolizmust és anaerob glikolízist indukál, ami laktátszint-növekedést és acidózist von maga után (Pulsinelli és mtsai., 1982; Beck és mtsai., 1995; Derdeyn és mtsai., 1999). A csökkenő ATP-szint kibillenti az érintett sejteket az anti- és proapoptotikus egyensúlyból, és ezáltal apoptózist indít el. Ha a hypoxia következtében jelentkező ATP-hiány átlépi a kritikus mértéket, akkor nem apoptózist, hanem nekrozist indukál (Nicotera és mtsai., 2000). A csökkenő ATP-szint következtében energiazavar lép fel, a membránok  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa működése károsodik, az extracelluláris

$K^+$  és az intracelluláris  $Na^+$  mennyisége megnő. A sejtmembránok depolarizációjában a feszültség függő  $Na^+$ -csatornákon keresztül és egyéb úton történő  $Na^+$ -beáramlásnak nagy jelentősége van (Leigh és Meldrum, 1996), amelynek révén a serkentő hatású glutamát felszabadulása fokozódik, illetve a glutamát sejtekbe történő  $Na^+$ -függő visszavétele zavart szenved. Ez maga után vonja a feszültségfüggő  $Na^+$  és  $Ca^{2+}$ -csatornák további aktiválódását, miáltal a  $Ca^{2+}$  sejtekbe történő beáramlása megnő (2. ábra).

Enyhe fokú vagy rövid ideig tartó ischaemia esetén a megváltozott  $Ca^{2+}$  homeosztázis rendeződhet. Hosszantartó vagy súlyos ischaemiás állapotokban azonban az intracelluláris  $Ca^{2+}$  mennyiségének szabályozása alapvetően károsodik. A fokozott  $Ca^{2+}$ -beáramlás miatt a serkentő glutamát felszabadulása tovább fokozódik, ami a sejtek glutamát receptorainak aktivációja útján újabb direkt és indirekt  $Ca^{2+}$  beáramlást okoz. Ezen felül két intracelluláris  $Ca^{2+}$ -raktár is kinyílik: az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium (White és mtsai., 2000). A  $Ca^{2+}$ -szint növekedése további glutamát felszabadulást okoz az axonterminálisokban (2. ábra), megváltoztatva a sejtek működését, ezáltal szöveti szintre emelve az apoptózis következményeit.



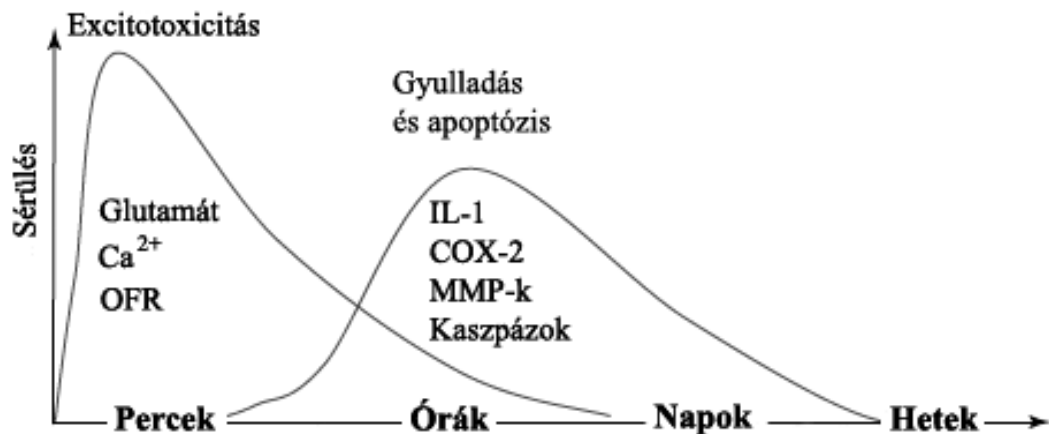
**2. ábra** Ischaemia hatásának vázlatja (Lyden és Wahlgren, 2000 alapján módosítva)

A megnövekedett  $[Ca^{2+}]$  az idegsejtek több  $Ca^{2+}$ -függő enzimét aktiválja. A foszfolipáz- $A_2$  a lipidmembrán közvetlen lízisét eredményezi (Mattson és mtsai., 2000), míg a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) aktivációja nitrogén-oxid és peroxi-nitrit képzése útján okoz lipid-peroxidációt (Kruman és mtsai., 1997).



A Bad proapoptotikus fehérje defoszforilációja az apoptózis végrehajtásának fázisába tolja a sejtet. A Bad defoszforilált formája ugyanis a Bcl-2 antiapoptotikus fehérjét kirekeszti a Bcl/Bax komplexből (Zha és mtsai., 1996), míg a Bax fehérje felszabadulva a kötésből képes arra, hogy az idegsejt mitokondriumainak membránján pórusokat képezzen (Antonsson és mtsai., 2000). Ekkor a mitokondrium megduzzad, lecsökken a membránpotenciálja, és megnő a  $\text{Ca}^{2+}$  tartalma (Sims és Anderson, 2002). A mitokondriumokból reaktív szabadgyökök mellett, apoptózis indukáló faktorok (Susin és mtsai., 1999) és citokróm-c (Li és mtsai., 1997) kerül a citoplazmába. Ezen folyamatok révén a sejt végérvényesen az apoptózis útjára lép.

Az ischaemiás esemény hatására kialakuló folyamatok pontos időbeli behatárolása nagyon fontos a hatásos terápia megtervezése érdekében. A fentebb leírt folyamatok közül a glutamát excitotoxicitás, a  $\text{Ca}^{2+}$  intracelluláris felhalmozódása és az oxigén szabadgyökök keletkezése az ischaemiás periódus után nagyon rövid időn belül (percek) megtörténik. A sejtek károsodott funkciója miatt kialakuló apoptózis és az ezzel egyidőben kialakuló gyulladásos folyamatok megindulása órákkal az ischaemiás periódus után kezdődik meg, és lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat (Dirnagl és mtsai., 2003) (3. ábra).



**3. ábra** Agyi ischaemiát követő változások kialakulásának időbeli vázlata  
(Dirnagl és mtsai., 2003 alapján módosítva).

OFR: oxigén szabadgyökök; IL: interleukin; COX: ciklooxygenáz; MMP: mátrix metalloproteináz

## **A hosszútávú szinaptikus aktiválódás:**

A hippocampus a deklaratív memória és a kognitív tulajdonságok feldolgozásának fő központja. A struktúrában az egyik leggyakrabban kutatott jelenség a szinaptikus plaszticitás különleges fajtája, a hosszútávú szinaptikus aktivitás-növekedés, azaz az LTP (long-term potentiation), amelyet először Bliss és Lomo írt le (1973) nyúl hippocampusában.

A hosszútávú szinaptikus hatékonyság fokozódás rövid ideig tartó nagy frekvenciás sorozatingerléssel (HFS) (Rose és Dunwiddie, 1986; Shors és Matzel, 1997), vagy theta burst ingerléssel váltható ki. A nagy frekvenciás ingerlés időbeli hossza és frekvenciája jelenti azokat a paramétereket, amelyek megszabják a plaszticitás mértékét és időbeli lefutását. Az LTP kialakulásának feltétele, hogy teljesüljön a kooperativitás (McNaughton és mtsai., 1978), az asszociativitás (Levy és Steward, 1979), a bemenet-specifikusság (Andersen és mtsai., 1977), valamint a tér és időbeli kapcsolat. A kooperativitás azt jelenti, hogy minimális számú axonnak együtt kell aktiválnia, mert egyetlen szinapszis részvételével nem alakul ki LTP. Az asszociativitás a különböző erősségű ingerek társítását jelenti, vagyis ha egy gyengébb ingert társítunk egy erősebbel, akkor a gyenge ingerre is nagyobb választ kell kapnunk. A bemenet-specifikusság ennek a társítási folyamatnak a pontosságát jelenti, vagyis azt, hogy csak az a szinaptikus kapcsolat erősödik meg, amelyik az ingerek társításában részt vett. A tér és időbeli kapcsolat arra utal, hogy az intracelluláris folyamatok lecsengési időtartományán belül kell találkoznia a két társítani kívánt ingernek (Bliss és Collingridge, 1993).

Az LTP típusát tekintve lehet asszociatív és nem-asszociatív jellegű. Az asszociatív forma N-metil-D-aszpartát (NMDA) receptor-függő, és ebből kifolyólag pre- és posztszinaptikus változások is történnek a két szinapszis társítása során, tehát a folyamat heteroszinaptikus. Ilyen típusú LTP indukálható a hippocampus CA3-as régiójából kiinduló Schaffer-kollaterálisok és a CA1-es régió piramis sejtjei között meglévő szinapszisokban (Bliss és Collingridge, 1993). A nem-asszociatív forma NMDA-független, egyszerűen egy inger ismételt adása váltja ki, ami preszinaptikus transzmitter felszabadulás fokozódást idéz elő (Kandel és Schwartz, 1982). Nem-asszociatív típusú LTP indukálható a hippocampus gyrus dentatus szemcsesejtjei és a CA3-as piramissejtek szinapszisaiban. Az asszociatív LTP tetanikus ingerléssel kiváltott indukciója után a preszinaptikus sejtől neurotranszmitterként felszabaduló glutamát a posztszinaptikus sejt glutamáterg ioncsatornáihoz kötődve  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást eredményez az intracelluláris térbe. A

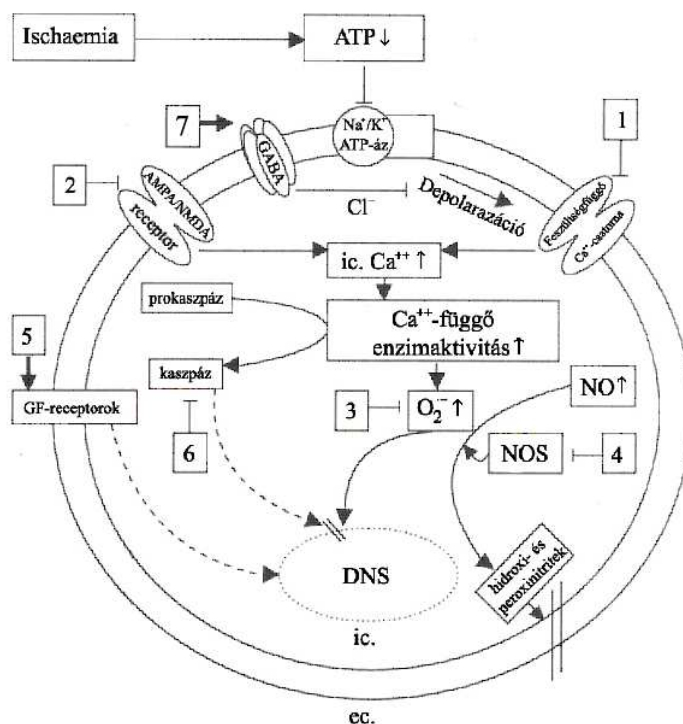
megnövekedett koncentráció lehetővé teszi a Ca-kalmodulin aktiválódását. A Ca-kalmodulin függő CaM kináz-II (Malinow és mtsai., 1988) és a PKC aktivitása (Akers és mtsai., 1986) együtt hozzájárul a retrográd messengerek felszabadulásához a posztszinaptikus sejtéből, amelyek a preszinaptikus sejt transzmitter leadását fokozzák (Kandel és Schwartz, 1982). Ilyen retrográd messengerek a nitrogén-monoxid (O'Dell és mtsai., 1991), és az arachidonsav (Barbour és mtsai., 1989). A PKA aktivitása az  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxalon-propionsav (AMPA) receptorok foszforilációját okozza, ami a glutamát bekötődése után a kationcsatorna fokozott nyitvatartását eredményezi (Kauer és mtsai., 1988). Ez segíteni fogja a koincidencia faktorként működő NMDA receptorok  $Mg^{2+}$  blokkjának eltávolítását, - amely addig a  $Ca^{2+}$  ionok beáramlását gátolta - míg az AMPA receptorok biztosítják a membrán depolarizáció létrejöttét a rajtuk történő  $Na^{+}$ -beáramlással. Bizonyos, kellő mértékű depolarizáció megszünteti az NMDA receptor  $Mg^{2+}$  blokkját, majd a bekötődő glutamát kinyitja az ioncsatornát, és a  $Ca^{2+}$  ionok számára szabaddá válik az út (Kandel és Schwartz, 1982; Bliss és Collingridge, 1993). Ezenkívül a PKA aktivitásának másik célpontját képezik a CREB (cAMP respond element binding) fehérjék, amelyek az új AMPA receptorok génjeinek transzkripcióját fokozzák, expressziójukat növelik. Következő lépésként az új glutamáterg AMPA receptorok expresszálódnak, amelyeket a  $Ca^{2+}$  ionok aktiválta Ca-kalmodulin kináz rögzít a membránon foszforiláció segítségével. A stabilizálódás fázisában érvényesül a Ca-kalmodulin MAP-kináz aktivitás növelő hatása, amely a génexpresszióra kifejtett hatásával segíti a szinaptikus fehérjék szintézisét, amelyeket a protein kinázok által elvégzett foszforiláció tesz majd alkalmassá a szinapszisok felépítésére (Bading és Greenberg, 1991). A késői LTP során a szinaptikus felület megnő, majd a perforációt követően a dendrit elágazik, és új szinapszist hoz létre (Geinisman és mtsai., 1991; Harris és mtsai., 2003). Mindezt a génexpresszió és fehérjeszintézis fokozódása is kíséri. Időbeli felosztásban a korai, vagy átmeneti fázis az LTP expresszióját jelenti, a retrográd messengerek és az újonnan expresszált AMPA receptorok megjelenésével bezárólag. A késői, vagy stabil fázis a stabilizálódást és az új szinapszisok keletkezését foglalja magában (Kandel és Schwartz, 1982; Bliss és Collingridge, 1993).

Egyre több tudományos eredmény támasztja alá azt a hipotézist, miszerint a hippocampus piramis sejtjeinek dendrittüskéi és tüskeszinapsziszai átrendeződése és stabilizálódása képviseli azt a sejt szintű mechanizmust, amely az LTP és a memória kialakulása és megőrzése mögött áll (Sorra és Harris, 2000; Kandel, 2001; Kasai és mtsai., 2003). A tüskeszinapszisok juttatják el szinte az összes glutamáterg, serkentő információt a piramis

sejtekhez, így a tüskeszinapszisok számának változása nagymértékben képes befolyásolni a sejtek ingerelhetőségét és válaszkészségét. Ráadásul ez a morfológiai változás igen gyors lehet, sebessége összemérhető az LTP kialakulásának sebességével (Fischer és mtsai., 1998; MacLusky és mtsai., 2005). A dendrittüske pufferelni képes az excitotoxicitás során megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -szintet (Yuste és Denk, 1995; Majewska és mtsai., 2000). Hálózat szintjén a hosszabb dendrittüskék szerepe az lehet, hogy elektromosan és biokémiaiilag lokálisan izolálja az excitotoxikus hatásokat. Az érintett neuronok dendritikus plaszticitása a stroke után is megfigyelhető, amely korai adaptív választ jelent, és segíti a neuront a posztischaemiás agyban lévő káros folyamatok kivédésében, mint pl. a megemelkedett  $\text{Ca}^{2+}$ -szint (Calabresi és mtsai., 2003) és a kúszó depresszió (Back és mtsai., 1994). Az 1990-es években úgy találták, hogy a hipoperfúzió fél évet meghaladó fennállása az LTP mechanizmusát is károsítja (Sekhon és mtsai., 1994; Sekhon és mtsai., 1997). Újabb vizsgálatok ennél sokkal rövidebb ideig tartó hipoperfúzióról is bebizonyították, hogy csökkenti az LTP indukálhatóságot; 20 perces kétoldali carotis leztorítás után már nem sikerült LTP-t kiváltania (Li és mtsai., 2006). *In vitro* kísérletekben ennél is rövidebb hypoxia (3-6 perc) elég volt az LTP indukálhatóságának jelentős lerontásához (Gasparova és mtsai., 2008). Krónikus hipoperfúzió kapcsán a kísérleti állatok tanulási képességének csökkenését többen megfigyelték (Kudo és mtsai., 1990; de la Torre és mtsai., 1992; Ohta és mtsai., 1997), és a motoros teljesítmény csökkenése is kimutatható volt (Sekhon és mtsai., 1997).

## Lehetséges neuroprotektív stratégiák:

A rekanalizáció az agyi vérrellátás csökkenésének, megszűnésének kiváltó okát megszüntető eredményes terápiás beavatkozás rendkívül fontos, de kiemelkedő jelentőségűek a stroke-ot követő, közvetlen idegsejt-megmentő (neuroprotektív) kezelések is (4. ábra). Az ischaemiás neuronpusztulás patomechanizmusának mind jobb ismerete kiszélesítette a lehetséges neuroprotektóra irányuló terápiás próbálkozások számát.



**4. ábra** Neuroprotektív terápiás stratégiák támadáspontjai: 1. feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonisták, 2. excitatórikus aminosav receptor antagonisták, 3. szabadgyökök antagonisták, 4. nitrogén-monoxid-szintetáz gátlók, 5. növekedési faktorok, 6. antiapoptotikus beavatkozás (kaspáz antagonisták), 7. GABA agonisták.  
ec.: extracelluláris; ic.: intracelluláris; ↑ nő; ↓ csökken  
(Zador és mtsai., 2004)

### Feszültségfüggő $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonisták:

Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  túlzottan nagymértékű beáramlása a sejtbe a sejthalálhoz vezető egyik döntő esemény. Ez az esemény az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázis felborulását, membránpotenciál változást és számos enzim aktiválását okozza, valamint szignáltranszdukciós kaskádokat indít be, amely végül sejtpusztulást eredményez. Agyat érintő ischaemiában a  $\text{Ca}^{2+}$  sejtbe történő bejutása lehetséges a feszültségfüggő és/vagy ligandfüggő (pl.: NMDA) ioncsatornákon keresztül.

A legrégebben vizsgált feszültség függő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonistá a *nimodipin* (RANTTAS, 1996), amely egy L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló. Több klinikai vizsgálatban a nimodipin nem mutatott védő hatást (Ahmed és mtsai., 2000; Fogelholm és mtsai., 2000). Az úgynevezett VENUS (very early nimodipine use in stroke) kipróbálásban a nimodipin a stroke-ot követő hat órán belüli adása esetén hatástalannak bizonyult (Horn és mtsai., 1999). Két további nagyszabású a nimodipinre vonatkozó vizsgálatot pedig le kellett állítani, azok eredménytelensége miatt (Bridgers és mtsai., 1991; Wahlgren és mtsai., 1999). Horn és Limburg (2000) a  $\text{Ca}^{2+}$ -antagonistákról írt meta-analízisében 7521 beteggel végzett 28 randomizált próba elemzése alapján kijelentette, hogy jelenleg nem megalapozott a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonisták hatékonysága az akut stroke kezelésében. Ezek a vizsgálatok ugyanakkor nem zárják ki jövőbeli még specifikusabb  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók lehetséges használatát. Például patkány kísérletekben az ischaemia okozta kérgi nekrosis ellen hatásos szernek mutatkozik az endoplazmatikus-retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkoló *dantrolene* (Hong és Chiou, 1998).

#### *Nátrium csatorna blokkolók:*

További lehetséges támadáspont a glutamát preszinaptikus felszabadulásának gátlása, amely  $\text{Na}^{+}$ -csatorna blokkolókkal sikeresnek bizonyult számos állatmodellben. Állatkísérletekben a *fosphenytoin* és a *sipatrigine* (BW619C87) hatékonynak bizonyultak (Chan és mtsai., 1998; Asakura és mtsai., 2000). A *fosphenytoin* humán kipróbálása nem igazolta a várakozást (Pulsinelli és mtsai., 1999). Klinikai vizsgálatban a BW619C98 (egy másik pirimidinderivátum) kipróbálását a harmadik klinikai fázisban leállították (Graham és mtsai., 1994; Chan és mtsai., 1998). A *lubeluzol* a stroke-ot követően hat órán belül adva a mortalitás nem változott, viszont a funkcionális vizsgálat a kezelt csoportban szignifikáns javulást mutatott (Grotta, 1997). Ezzel az USA-ban készített vizsgálattal ellentétben a *lubeluzol* egy európai és ausztrál klinikai kipróbálásban funkcionálisan is hatástalannak bizonyult (Lees, 1998).

#### *Gyors $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna blokkolók:*

Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelkedés okozta citotoxicitást a receptor regulált gyors  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák szintjén is megvizsgálták. A receptor regulált gyors  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák metabotróp és ionotróp típusra oszthatók. Az ionotróp csatornák specifikus ligandjaik alapján NMDA és AMPA típusokra különülnek el. Az NMDA-komplex képezi a neuroprotekciónak elsődleges célpontját.

#### *Nem-kompetitív NMDA antagonisták:*

A *magnézium* nagy dózisban endogén vasodilatorként működik, valamint nem-kompetitív NMDA-receptor és feszültségfüggő- $\text{Ca}^{2+}$ -csatorna antagonistaként is viselkedik. Jelenleg a magnézium kezelés a stroke-ot követő 12 órán belül adva a klinikai III. fázisában van (Clark és mtsai., 2000). A *dizolcipin* (MK-801) túlzottan erős klinikai mellékhatásai miatt nem került kipróbálásra (Gorgulu és mtsai., 2000). A *memantin* (1-amino-3,5-dimetil-adamantam) szintén hatásosnak bizonyult patkány stroke modellben. A neurológiai deficit, a stroke mérete és az ödémaképződés egyaránt szignifikáns mértékben csökkent, csekély mellékhatások mellett (Stieg és mtsai., 1999). Tervezik a vegyület humán kipróbálását is.

A poliamin lókuszon támadó antagonisták képviselője az *eliprodil*, amely egy lassú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornablokkoló. Agyi infarktusos betegeknél nem okozott pszichostimuláns mellékhatásokat, vérnyomás- illetve szívfrekvencia-emelkedést. A kipróbálást a III. fázisban mégis leállították a terápia hatástalansága miatt (Giroux és mtsai., 1994). A glicin lókuszon támadó antagonisták közül a *gavestinel* egy jól tolerálható és kevés mellékhatást okozó szer volt a klinikai III. fázisban, de az MR-vizsgálatok nem mutattak csökkenést az infarktus méretében (Warach és mtsai., 2006). A nem endogén NMDA-antagonisták fő problémája, hogy nagyrészüket pszichotomimetikus mellékhatással bír. Sőt egyes szerek, mint például a *selfotel* még rontották is a halálozási arányt, amiért klinikai vizsgálatait le kellett állítani (Davis és mtsai., 2000).

Hatásos vegyületek lehetnek az endogén *kinurénsav* (KYNA) és származékai, valamint a kinurénsav előanyaga az *L-kinurenin* (L-KYN), amelyek nemcsak stroke, hanem egyéb neurológiai kórképek esetén is potenciális neuroprotektív szerként működhetnek (Salvati és mtsai., 1999; Nemeth és mtsai., 2004; Robotka és mtsai., 2005; Gigler és mtsai., 2007; Sas és mtsai., 2008).

#### *Szabadgyök-antagonisták:*

Az ischaemia időtartama és a reperfüzió során megnő a reaktív szabadgyökök keletkezésének aránya (Coyle és Puttfarcken, 1993). Úgy tűnik, hogy a lipidmembrán peroxidációja az az elsődleges mechanizmus, amin keresztül a szabadgyökök károsítják az agyszövetet. A szabadgyökök képződését gátló, illetve a hatástalanításukat elősegítő vegyületek potenciális neuroprotektánsok lehetnek. A *tirilazad* az egyik ilyen vegyület. Hatását hat különböző tanulmányban vizsgálták; a két legnagyobb horderejű a European-Australian Study és az American Study egymásnak ellentmondó eredménnyel zárult: az első vizsgálatban a kezelt betegcsoport nagyobb mortalitást mutatott, mint a placebo

csoport, ezért a tanulmányt nem folytatták (Haley, 1998), míg az amerikai tanulmány ellentétes trendet igazolt (RANTTAS, 1996). A szabadgyök fogók közül a szervezet saját antioxidáns rendszeréhez tartozik az *aszorbinsav* (C-vitamin) és az  *$\alpha$ -tokoferol* (E-vitamin). Érdeemes megjegyezni, hogy a C-vitamin nagy dózisú adagolása modulálhatja az NMDA-receptor blokkolók neuroprotektív hatásait, mivel a C-vitamin nagy affinitással kötődik az NMDA-receptor redox regulálóhelyéhez, ezáltal permanens receptorinhibíciót idézve elő (Majewska és Bell, 1990; Majewska és mtsai., 1990).

#### *Nitrogén-oxid-szintetáz-gátlók:*

Megfigyelések szerint a NO-agonisták, az L-arginin korai adása, vagy az indukálható nitrogén monoxid szintetáz (NOS) specifikus gátlóinak alkalmazása hatásos stroke-ban (Dawson, 1994). A NOS-gátlók humán terápás lehetőségei azonban további klinikai vizsgálatokra szorulnak.

#### *Növekedési faktorok:*

Állatkísérleti adatok szerint a növekedési faktorok csökkentik az infarktus kiterjedését, és elősegítik az idegi működés helyreállítását (Karhunen és mtsai., 2005).

#### *Antiapoptotikus beavatkozások:*

Az infarktus kiterjedésének másodlagos növekedésében döntő szerepet játszik az apoptotikus sejthalál befolyásolása (Lee és mtsai., 1999).

#### *Gamma-amino-vajsav-agonisták:*

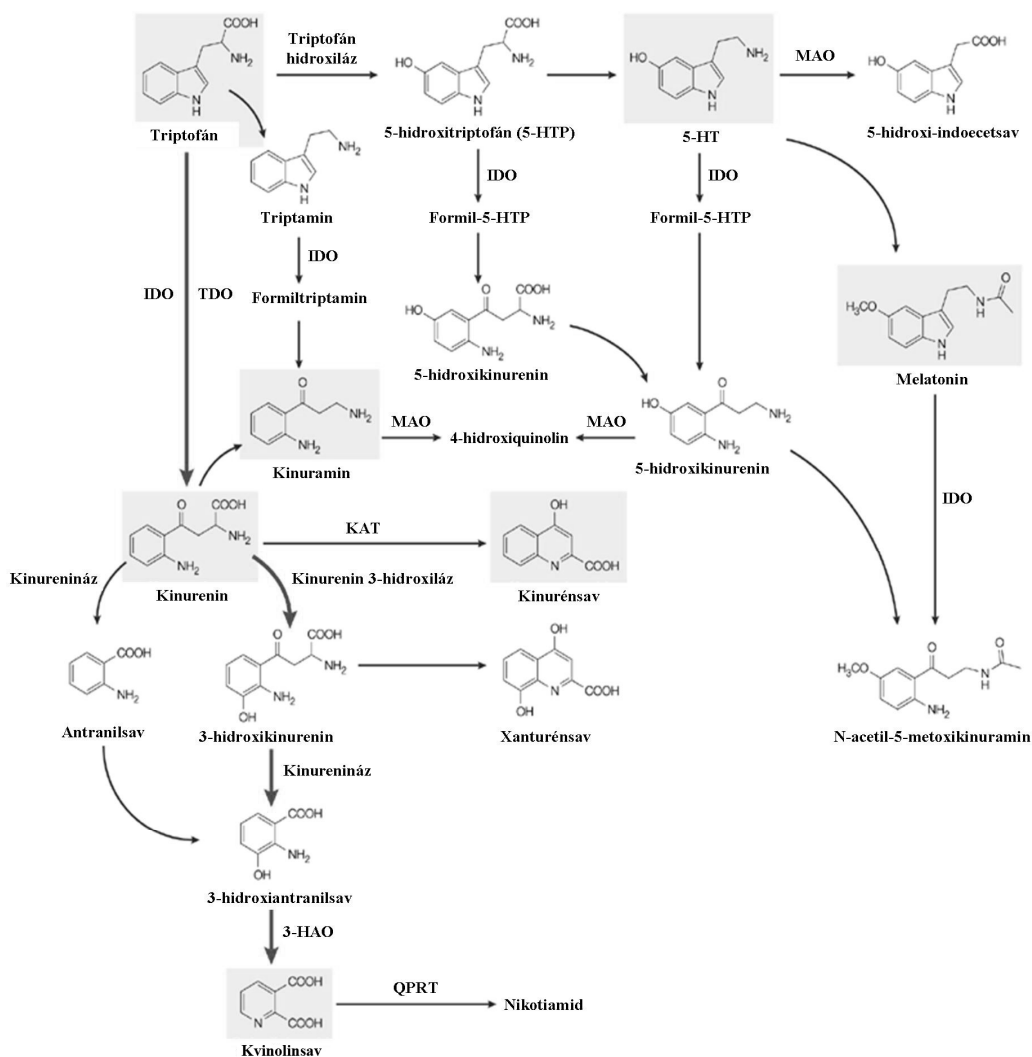
A gamma-amino-vajsav (GABA) a legfontosabb gátló neurotranszmitter, amely bizonyos fókig ellensúlyozni képes az excitatórikus glutamát hatását. A *clomethiazol* potenciálisan neuroprotektív GABA agonista szernek látszik (Cross és mtsai., 1991; Snape és mtsai., 1993; Cross és mtsai., 1995; Sydserff és mtsai., 1995a; Sydserff és mtsai., 1995b). A *clomethiazol* patkány kéregben csökkentette az ischaemia okozta glutamát felszabadulást (Nelson és mtsai., 2000). Klinikai vizsgálatban a mortalitási adatok nem javultak komplett agyi infaktusban, noha több betegnél funkció javulást tapasztaltak (Wahlgren és mtsai., 1999), újabb vizsgálatok jelenleg is folyamatban vannak (Lyden és Wahlgren, 2000).

Jelentős mennyiségű kísérletes adat igazolja a *hipotermia* jótékony és a *hipertermia* kártékony hatását stroke-ban (Gunn és Thoresen, 2006; Lang és mtsai., 2007). Egyes kísérletes vizsgálatok szerint az *ösztrogén* neuroprotektív hatásúak lehetnek (Wang és mtsai., 1999; Lapchak és mtsai., 2000; Bagetta és mtsai., 2004; Li és mtsai., 2004; Juhasz-Vedres és mtsai., 2006), mivel csökkentik az idegsejtek ischaemia érzékenységét.



## A kinureninek:

A kinurénsavat 1853-ban írta le először Justus von Liebig (Liebig, 1853). Az 1900-as évek elején Ellinger és Homer felismerte, hogy a KYNA a triptofán anyagcsere során keletkező termék (Ellinger, 1904; Homer, 1914). A triptofán metabolizmus ezen ágát kinurenin útvonalnak, az anyagcsere-termékeket pedig kinurenineknek nevezték el (5. ábra).



Nature Reviews | Drug Discovery

**5. ábra** A triptofán metabolizmusa (Stone és Darlington, 2002 alapján módosítva).

5-HT: 5-hidroxitriptamin; 3-HAO: 3-hidroxi-antranilsav oxidáz; IDO: indolamin-2,3-dioxigenáz; KAT: kinurenin aminotranszferáz; MAO: monoamin oxidáz; QPRT: kvinolénsav foszforibozil transzferáz; TDO: triptofán-2,3-dioxigenáz

Az L-KYN alacsony koncentrációban megtalálható a vérben, az agyszövetben és a perifériás szervekben egyaránt (Stone és Darlington, 2002). Könnyen átjut a vér-agy gáton a nagy neutrális aminosav transzporterek segítségével (Christensen, 1984; Speciale és mtsai., 1989). A L-KYN az agyba kerülve belép az asztrocitákba, ahol transzaminálódik,

és KYNA-vá alakul (Bender és McCreanor, 1982; Moroni, 1999), amely folyamatot a kinurénsav-transzamináz (KAT) enzim végzi. Az 1980-as években mutatták ki a KYNA jelenlétét a humán agyszövetben. Legnagyobb koncentrációban a nucleus caudatusban mutatták ki, de jelen van a thalamusban, a hippocampusban, a parietális és frontális kéregben is (Turski és mtsai., 1988).

A KYNA több receptor működését is befolyásolja, széles spektrumú serkentő aminosav receptor antagonist, amely kis koncentrációban kompetitív NMDA receptor antagonistaként működik. Az NMDA receptoron a sztichin-inszenzitív glicinkötő helyhez képes bekötődni (Birch és mtsai., 1988; Kessler és mtsai., 1989). A glicin az NMDA receptoron glutamát koagonistaként viselkedik és megnöveli a receptor affinitását az endogén glutamáttal szemben (Laube és mtsai., 1997). A glicinkötő hely antagonistái tehát az NMDA receptor működését gátolják. A KYNA nagyobb koncentrációban kompetitív antagonistája az AMPA és kainát receptoroknak is (Stone és Connick, 1985; Bertolino és mtsai., 1989; Kessler és mtsai., 1989). Továbbá a KYNA a nikotinerg rendszerrel is kapcsolatban áll, mivel képes az  $\alpha$ -7 nikotinos acetilkolin receptorokat blokkolni (Hilmas és mtsai., 2001). Kutatások kimutatták, hogy a KYNA termelődés mértéke a glutamáterg szinapszisok közelében elhelyezkedő asztrocitákban a legnagyobb mértékű, ezáltal az asztrocitákból felszabaduló KYNA az NMDA és AMPA receptorok működését lokálisan hatékonyan képes befolyásolni.

Fukui és munkatársai (1991) poláris sejtkultúrán végzett kísérleteinek eredményei azt mutatják meg, hogy a KYNA nem vagy igen csekély mértékben képes átjutni a vér-agy gáton. Az agyszövetből történő kiürülése csak a probenecid (PROB) érzékeny szervessav transzportereken keresztül történhet (Moroni, 1999).

Különböző neurodegeneratív kórképekben a KYNA abszolút vagy relatív koncentrációja az agy bizonyos területein eltér a fiziológiás értéktől (ember esetében 1 mM (Turski és mtsai., 1988)). Huntington-kóros betegek striátumában csökkent KYNA szintet mértek (Beal és mtsai., 1992; Jauch és mtsai., 1995), ezzel szemben a kvinolénsavat szintetizáló enzim (3-HAO) aktivitása megnő. Parkinson-kórban szenvedő betegeknél fiziológiás szintnél kisebb koncentrációjú KYNA szint tapasztalható a frontális kéregben és a putamenben (Ogawa és mtsai., 1992). Csökken a KYNA szint Alzheimer-kór esetében is (Hartai és mtsai., 2007), de a megemelkedett kvinolénsav szint is szerepet játszhat a kór kialakulásában (Guillemin és mtsai., 2003). Schizofréniában emelkedett KYNA értéket találtak (Erhardt és mtsai., 2001). A triptofán anyagcsere metabolitjait az epilepsziás megbetegedésekkel is összefüggésbe hozták. WAG/Rij patkányokon – amely egy az

epilepsziára szelektált patkány törzs – végzett vizsgálatok az állatok frontális kérgében szignifikánsan alacsonyabb KYNA szintet mutattak a nem epilepsziás kontrollhoz képest (Kaminski és mtsai., 2003). A KYNA antikonvulzáns és neuroprotektív tulajdonságokkal rendelkezik epilepsziás modellekben (Foster és mtsai., 1984; Battaglia és mtsai., 2000; Kaminski és mtsai., 2003; Nemeth és mtsai., 2004; Robotka és mtsai., 2005).

A fentebb részletezett irodalom és a később ismertetendő saját kísérleteink alapján is úgy tűnik, hogy a KYNA és előanyagának az L-KYN-nek a használata potenciális neuroprotektív kezelési megoldásnak tűnik ischaemiás inzultus után fellépő idegsejt-károsodás kivédésre illetve visszafordítására.

## A glutamát scavenging lehetősége:

Napjainkban már tudott tény, hogy a glutamát (Glu) – a legfőbb serkentő neurotranszmitter és excitotoxin – nemcsak a szinapszis jól behatárolt környezetében fejti ki hatását, hanem hatása nagyon nagy kiterjedésű agyterületen érvényesül. Mindkét esetben Glu-transzporterek (excitatorikus aminosav transzporterek: EAAT-ek) szabályozzák a Glu hatásának térbeli kiterjedését (Beart és O'Shea, 2007) a Glu neuronokba és gliákba történő visszavétele révén.

A legáltalánosabban elfogadott kép a glutamáterg szinapszis felépítéséről a következő: a szinapszis áll egy preszinaptikus végződésből, amely tartalmazza a Glu-tal teli vezikulákat, továbbá egy posztzinaptikus membránból, amelyen nagy sűrűséggel vannak a Glu receptorok, és az egészet körbeveszik a gliális membrán részek, amelyek gazdagok EAAT-ben. Ez az elrendeződés megakadályozza a serkentés nagymértékű térbeli kiterjedését (Rusakov és Kullmann, 1998; Savtchenko és Rusakov, 2004; Savtchenko és Rusakov, 2005). Azonban a Glu serkentő hatása nem korlátozódik csak a szinapszusra. Tény, hogy vezikuláris glutamát felszabadulás történik glia sejtekből is, amely hatására egy jóval diffúzabb kiterjedésű serkentés jön létre (Montana és mtsai., 2006; Vesce és mtsai., 2007). Az agyat ért patológiás események során – stroke, traumás sérülés stb. – kontrollálatlan módon megnő a Glu felszabadulás az idegi és gliális raktárakból, ilyenkor az EAAT-ek a Glu visszavétellel fordított irányban működnek, azaz a Glu sejtekből történő leadásának irányába (Vesce és mtsai., 2007). Ennek az az oka, hogy a tartósan depolarizált állapotba került sejtek EAAT-i „reverz” módon működnek. Az endotél falában lévő EAAT-ekre ez nem vonatkozik (Vesce és mtsai., 2007). Ez a koordinálatlan Glu felszabadulás okozza azt az extrém magas Glu-szintet, amely ilyen patológiás körülmények között a kiterjedt neuronkárosodást és neuronpusztulást okozza. A Glu káros hatását az érintett részt körülvevő ép agyterület jól működő EAAT-ei fékezhetik meg.

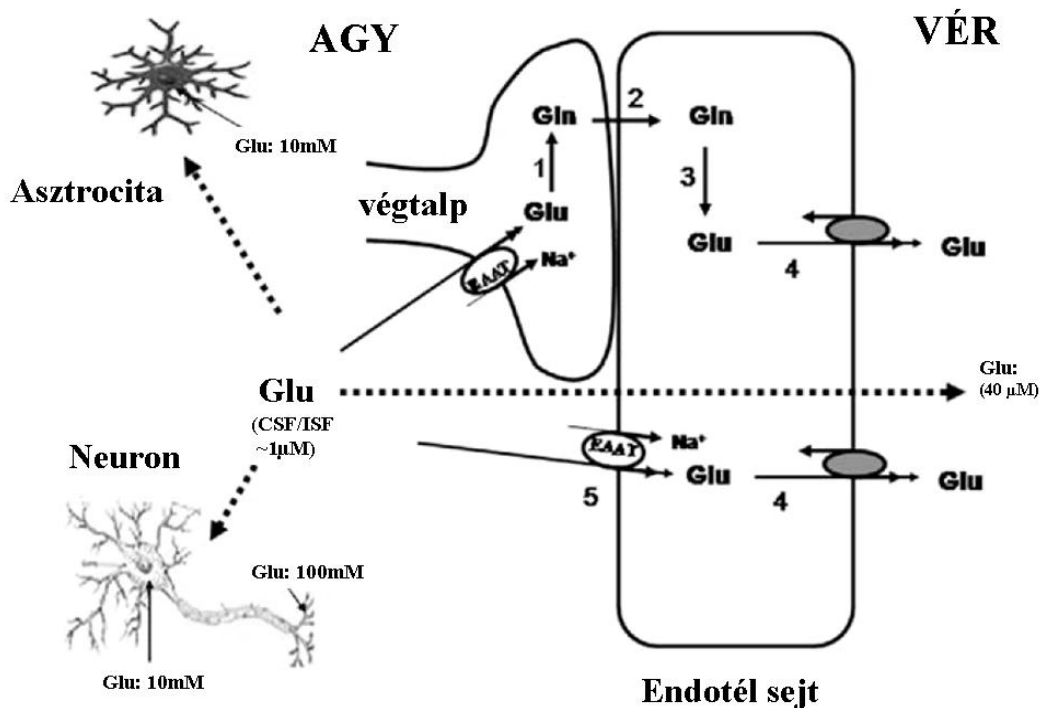
Ezen felül nem szabad elfeledkezni arról sem, hogy az agy nagyon jól ellátott érhálózattal. Az agy közel 100 millió kapillárisal rendelkezik, tehát kis túlzással az agyban majdnem minden neuron rendelkezik saját kapillárisal. Az átlagos távolság egy kapilláris és egy idegsejt között 8-20  $\mu\text{m}$  (Bickel és mtsai., 2001). Az agyi érhálózat is igen gazdag EAAT-ben, de nemcsak az érfal, hanem az azt körülvevő asztrocita végtalpakon is számos EAAT-t találunk (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995). Így tehát az agyi erek EAAT-

ei felelősek a nagyon jelentős, de még kevésbé ismert, agyból a vérbe történő Glu effluxért, és az agyi Glu homeosztázis fenntartásért.

Kísérleti eredmények bizonyították, hogy az ellentétes irányú (vérből az agy felé) Glu transzport igen korlátozott (al-Sarraf és mtsai., 1995; al-Sarraf és mtsai., 1997b; al-Sarraf és mtsai., 1997a; al-Sarraf és Philip, 2003) és nagyon lassú is (Oldendorf, 1971; Sershen és Lajtha, 1976). Az agyból a vérbe történő efflux ugyanakkor nagyon gyors. Az efflux a kapillárisok antiluminális oldalán található  $\text{Na}^+$ -függő EAAT-eken keresztül zajlik (O'Kane és mtsai., 1999). Elmondható tehát, hogy a Glu felesleg eltávolításáért nemcsak a neuronokon és gliákon található EAAT-ek felelősek, hanem a folyamatban az agyi kapilláris hálózat transzporterei is fontos szerephez jutnak. Az EAAT három altípussal rendelkezik (EAAT1, EAAT2, EAAT3). Az EAAT1 és EAAT2 az asztrocita végtalpakon gyakoribbak mint a kapilláris endotél sejteiben (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995; Danbolt, 2001). Mind a három altípus megtalálható az érendotél sejtek abluminális oldalán is (O'Kane és mtsai., 1999).

*Milyen mechanizmussal történik az agyból a vér irányába történő Glu felesleg eltávolítása?*

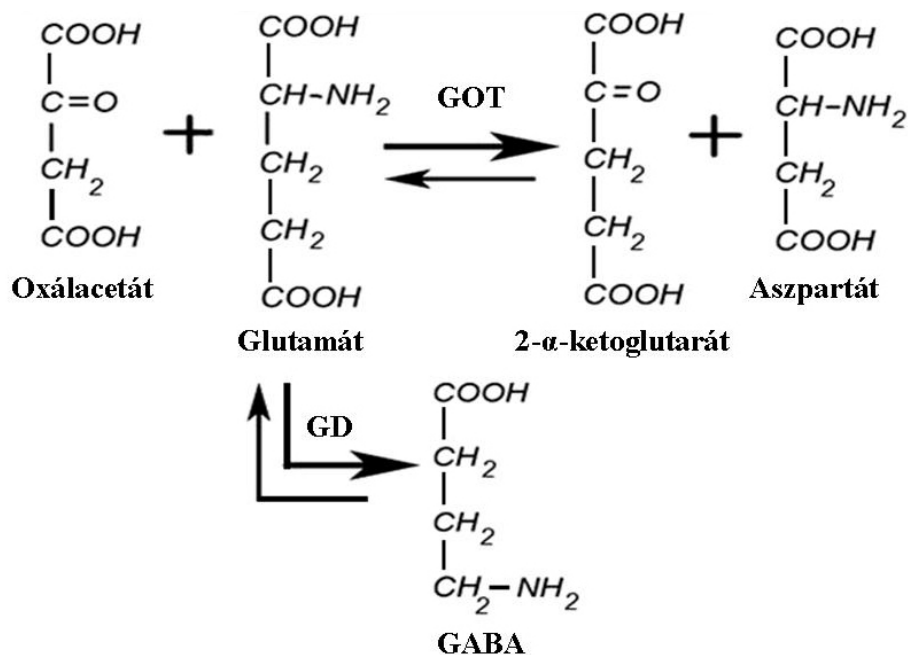
Az agyból vérbe történő Glu efflux az agyi interstitiális tér és a vérplazma között fennálló kedvezőtlen koncentráció-gradiens ellenére is megtörténik. Az interstitiális folyadékban (ISF) és a cerebrospinalis folyadékban (CSF) a Glu koncentráció 1-10  $\mu\text{M}$ , míg a vérben 40-60  $\mu\text{M}$ . Az extracelluláris Glu transzportja az érendotél antiluminális oldalán megtalálható  $\text{Na}^+$ -függő transzporterek működése révén történik. Amint az endotél sejtben lévő Glu koncentráció meghaladja a plazmában lévő Glu koncentrációt, a Glu transzportja megtörténik a kapilláris lumene felé (6. ábra) (O'Kane és mtsai., 1999).



**6. ábra** A Glu koncentráció a CSF-ben (1  $\mu$ M), a neuron kitüntetett részein (szóma 10 mM, axonterminális 100 mM), az asztrocitákban (10 mM) és a vérben (40  $\mu$ M). Az asztrocita végtalpak felveszik a felhalmozódott Glu-ot az ISF-ből, ahol is a Glu átalakul glutaminná (Gln) a glutamin szintetáz által (1). A keletkezett Gln az endotél sejtek abluminális membránján lévő neutrális aminosav transzporterek révén átkerül az érendotél sejtekbe (2). Itt a Gln visszaalakul Glu-tá a glutamináz enzim működése révén (3), az így keletkezett Glu facilitatív transzport révén (4) átjut a vérbe. Az érendotél abluminális membránján is találunk EAAT-ek (5), amelyek speciális fiziológias és patofiziológias körülmények között képesek a Glu-ot közvetlenül bejuttatni az endotél sejbe. Ebben az esetben a Glu transzport sokkal hatásosabb és gyorsabb. Az endotél sejtből megemelkedő Glu-koncentráció meghaladja a vér 40  $\mu$ M-os Glu koncentrációját és így facilitált transzporttal a Glu átkerül a vérbe. Ez a transzport addig zajlik, amíg a koncentráció viszonyok azt engedik. (Teichberg és mtsai., 2009 alapján módosítva)

#### *Az agyból a vérbe történő Glu efflux serkentésének lehetősége*

Ha a vérben sikerül lecsökkenteni a Glu koncentrációt, akkor ez egy megnövekedett szívóerőt jelenthet az agyi Glu efflux számára. Gottlieb és munkatársai (2003) a vér Glu-szintjének lecsökkentéséhez a vérben található enzimek, a glutamát-piruvát transzamináz (GPT) és a glutamát-oxálecetsav transzamináz (GOT) működését használták ki. Ezen enzimek kosubsztrátjai a piruvát és az oxálecetsav (7. ábra). Ha vérben megnövekszik az oxálecetsav (OxAc) vagy a piruvát (Pyr) szint, akkor az enzimreakció eltolható a Glu átalakítás irányába.



**7. ábra** A glutamát-szint csökkentésének lehetősége a vérben  
 GOT: glutamát-oxálecetsav transzamináz; GD: glutamát-dekarboxiláz

A hipotézist Gottliebék az agykamrába juttatott radioaktívan jelölt Glu-tal bizonyították be. Kezdetben figyelték az alap Glu-szintet a vérben, valamint a jelölt Glu megjelenését. Miután a radioaktív jel elért egy állandó szintet a vérben, OxAc-ot/Pyr-ot juttattak a keringésbe, és a továbbiakban mérték a Glu-szintet és a radioaktív jel mértékét. A kísérleteik alapján azt tapasztalták, hogy a Glu vérszérumbeli csökkenése 15 perccel az OxAc kezelés után éri el annak a maximumát (Zlotnik és mtsai., 2007). Ezen bizonyítékok alapján látható, hogy a Glu scavengerek (pl.: OxAc) alkalmazása által az agyi ISF-ből és CSF-ből a vérbe történő Glu efflux a vér Glu-szintjének lecsökkentése révén megnövelhető.

## **Állatkísérletes modellek az agyi hipoperfúzióra/ischaemiára:**

Az állatkísérletekben alkalmazott hipoperfúziós/ischeamiás modellek közül leggyakoribb módszer valamely az agyat ellátó nagy artéria, vagy artériák irreverzibilis és/vagy reverzibilis elzárása.

A nem teljes agyi ischaemia modellje az úgynevezett két ér leszorításos modell (two-vessel occlusion, 2VO), amely esetében a két arteria carotis communis zárják el hosszabb-rövidebb ideig. Ezen állat modell alkalmazása során az agyi vérátáramlás tartós 25-50%-os csökkenése mintegy fél év után magatartászavarok kialakulásához vezet anélkül, hogy kimutatható neuropatológiai elváltozást okozna. A súlyos kétoldali carotis tenzió csökkenés, vagy a régóta fennálló arteriovenosus malformatio okozta patofiziológiai, magatartási és patológiai elváltozások valószínűleg a krónikus hipoperfúzió következtében alakulnak ki (Sekhon és mtsai., 1997). Wistar patkányok hippocampusának vérellátása 2,5 órás kétoldali carotis okklúzió (two-vessel occlusion, 2VO) hatására a kontroll szint 52%-ára esik vissza, míg ez az érték 2 nap elteltével 70%, egy hét elteltével 74%; 3 hónapos 2VO esetében pedig a kontroll szint 90%-át éri el újra, amíg a kéreg a vérellátása 2,5 órás 2VO hatására a kontroll szint 35%-ára esik vissza. Ez az érték 2 nap elteltével 43%, egy hét elteltével 71%, 3 hónapos 2VO esetében pedig a kontroll szint 80%-át éri el újra (Tsuchiya és mtsai., 1992; Tsuchiya és mtsai., 1993). Mindez annak köszönhető, hogy patkány esetében az agyi vérellátást biztosító Willis-kör teljes az arteria basillaris felől, így a véráramlás redisztribúciójára van lehetőség. Olyan rágcsálók esetében, amilyen az afrikai futóegér (*Gerbillus gerbillus*), amelyeknél a Willis kör nem teljes, a carotis leszorítás teljes ischaemiás állapotot idéz elő a carotis communis által vérrel ellátott agyterületeken (Kaundal és mtsai., 2009). A 2VO paradigmát krónikus agyi hipoperfúzió (atherosclerosis, arteriovenosus malformatio) és egyéb csökkent véráramlással járó betegségek pl. Alzheimer-kór (De Jong és mtsai., 1999; Farkas és Luiten, 2001) modellezésére szokták használni.

Sokkal súlyosabb hatású, teljes agyi hypoxiát okozó modell az úgynevezett 4 ér elzárásos (four-vessel occlusion, 4VO) modell (Pulsinelli és Brierley, 1979). Ebben az esetben a két arteria carotis reverzibilis elzárása mellett az arteria vertebralisokat előzetesen irreverzibilisen roncsolják. A carotis okklúzió idejére a teljes agy vérkeringés nélkül marad. Fél órás 4VO esetén a vérátáramlás a kontroll szint 40%-ára csökken a nyúltvelőben, 18%-ára az amygdalában, 6%-ára esik vissza a hippocampusban, és szinte teljesen megszűnik a neocortexben (Schmidt-Kastner és mtsai., 1989). Az elvezetett



elektroencephalogramm által mérhető jel teljesen kisimul (Pulsinelli és Brierley, 1979). Ez a beavatkozás jól modellezi a hirtelen szívmegállás során kialakuló állapotot.

## Célkitűzés:

1. A KYN és KYNA neuroprotektív hatását már számos esetben vizsgálták és leírták. Munkacsoportunk is jelentős eredményeket ért el ezen a téren, legfőképp hisztológiai és magatartásvizsgáló módszerek alkalmazása révén. Azonban alig van adat a kérdéses anyagok neuroprotektív hatásának elektrofiziológiai vizsgálatára. **Kísérleteinkben a KYN neuroprotektív hatásának elektrofiziológiai vizsgálatát tűztük ki célul teljes előagyi ischaemia esetén.**
2. Traumás zárt fejsérülés állatkísérletes modelljén az oxálecetsav adásának neuroprotektív hatását írták le pár évvel ezelőtt (Gottlieb és mtsai., 2003). **Munkacsoportunk bekapcsolódott ezekbe a vizsgálatokba és az itt másodikként bemutatott kísérletsorozatban az oxálecetsav neuroprotektív hatásának vizsgálatára törekedtünk globális agyi hipoperfúzió (nem teljes ischaemia) esetén.**

## Anyagok és módszerek:

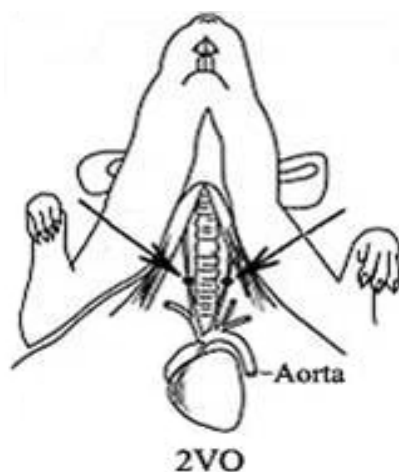
### Állatok:

Kísérleteinkben felnőtt Charles-River (n=101) patkányokat használtunk fel. Az állatok 220-320 g súlyúak voltak. Az állatokat minden esetben egyesével, szabványos műanyag ketrecekben tartottuk szabad hozzáférést biztosítva számukra az élelemhez és a vízhez. Az állatházban 12:12 órás sötét-világos periódust és 23°C hőmérsékletet biztosítottunk. Minden esetben betartottuk a laboratóriumi állatok gondozásával kapcsolatos alapelveket (NIH Publikáció No. 85-23), a Szegedi Tudományegyetem Etikai Bizottsága által jóváhagyott állatgondozással kapcsolatos protokollt (1998), és az Európai Közösségek Tanácsának 1986. november 24-i rendeletét (86/609/EEC).

### Ér okklúzió:

*Kétoldali carotis communis okklúzió az in vitro elektrofiziológiához és szövettanhoz:*

Átmeneti (30 perces) kétoldali carotis communis (common carotid artery, CCA) (Tsuchiya és mtsai., 1992; Tsuchiya és mtsai., 1993) okklúziót idéztünk elő 4%-os klorál-hidrát oldattal altatott állatokon (8. ábra). Az altató adagolása 1 ml/100 ttg dózisban i.p. adással történt. Preparálás során a CCA-kat feltártuk, eltávolítottuk a vagoszimpatikus idegköteget, az eret cérnára vettük, majd sérülést nem okozó aneurizmás csipesszel (Aesculap, B. Braun Orvosi Kft.) elzártuk az eret.



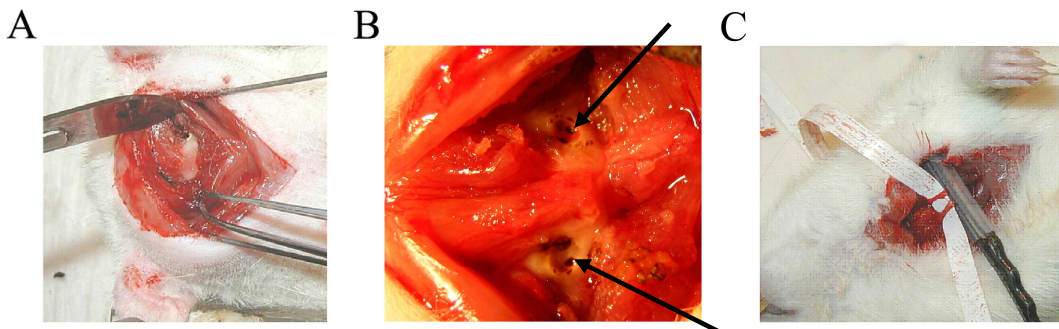
**8. ábra** A 2VO műtéti elrendezése. A nyilak az okklúzió helyét jelölik (Farkas; 2001)

A műtét alatt az állatok testhőmérsékletét feedback-szabályozott infralámpával tartottuk 37±0,5 °C között. A 30 perces érelzárást követően a CCA felengedésével visszaállítottuk a keringést. A 3 napos felépülési idő miatt a sebbe antibiotikumot (Strepto-Fatol, FATOL

Arzneimittel GmbH) juttattunk az esetleges fertőzések elkerülése érdekében, végezetül a sebet bezártuk. Az álműtött kontroll (sham control, s.c.) patkányokon a fent leírt folyamatokat hajtottunk végre CCA okklúzió nélkül. A műtétet, a műtét utáni regenerációs időt (3 nap) az állatok 100%-a túlélte. 3 nappal a műtét után történt az *in vitro* elektrofiziológiai vizsgálat és a hozzá kapcsolódó szövettan előkészítése.

*Kétoldali carotis communis és kétoldali arteria vertebralis okklúzió (4VO):*

A 4VO módszer kiválóan alkalmas kétoldali, teljes átmenti ischaemia előidézésére altatott patkányok esetén (Pulsinelli és Brierley, 1979). Az állatokat a műtét első napján Nembutallal (CEVA-PHYLAXIA; 60 mg/kg, i.p.) altattuk. A műtét kezdetén az állatok tarkóját elektromos hajnyíróval leborotváltuk, majd az állatok fejét erre a célra kialakított befogóba rögzítettük. A befogás során az állatok orrát a lehető legjobban lenyomtuk, hogy a tarkó tájék minél jobban hozzáférhető legyen. A bőrt és az alatta lévő izmot ollóval megvágtuk. A mélyebben fekvő izmokat csipesszel tompán szétfejtettük. A sebet sebterpesszel kitágítottuk. Az első csigolyát a harmadik réteg izomtól is megtisztítottuk. A megtisztítás után láthatóvá válik a foramen alare egy kis arteriolával. A felhevített hegyű kautert a gerinc tengelyével közel párhuzamos síkban a foramen alare-ba helyeztük, rögtön azután jeges mosással hűtöttük a roncsolás helyét és a csontot technikai fúróval kissé megfúrtuk, majd ismét hűtöttük a csigolyát (9./A ábra). A folyamatot addig ismételtük, amíg az arteria vertebralis csigolyában alkotott hurkának két ága szemmel láthatóan el nem vált egymástól (9./B ábra). A hűtés a közelben elhelyezkedő nyúltvelő és gerincvelő épségének megóvására szolgált. A műtét végén a sebbe antibiotikumot (Strepto-Fatol, FATOL Arzneimittel GmbH) juttattunk az esetleges fertőzések elkerülése érdekében, végül a sebet összevarrtuk. A második nap 12 órával a CCA preparálás előtt az állatoktól megvontuk az ételt. A CCA preparáláshoz az állatokon éter belélegeztetéssel felületes narkózist alakítottunk ki. A CCA-okat megtisztítottuk a vagoszimpatikus idegkötegtől, majd sérülést nem okozó csipesszel 10 percre elszorítottuk (9./C ábra).



**9. ábra** 4VO műtét legfőbb pontjai. **A:** az arteria vertebralis feltárása kauter és fúró segítségével. **B:** a feltárt és elégetett arteria vertebralisok (nyíl). **C:** kétoldali irreverzibilis carotis okklúzió traumát nem okozó csipesszel

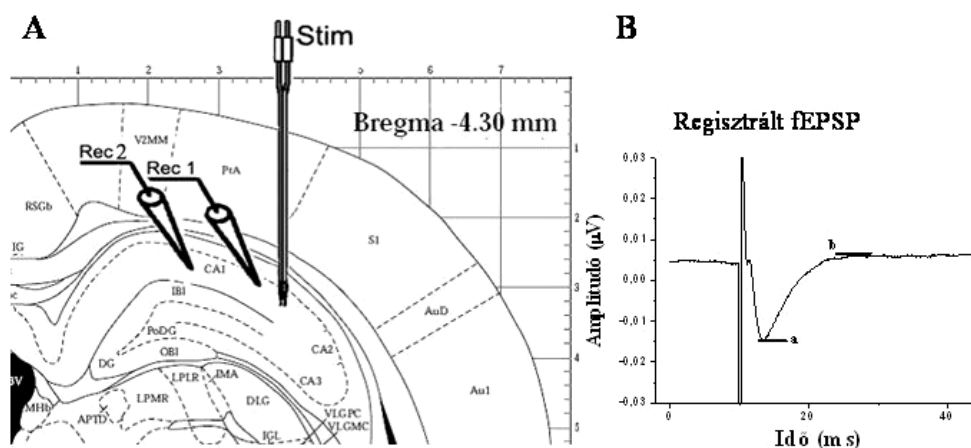
Az álműtött állatok esetében nem történt meg a carotis leszorítása. Azt, hogy a carotis lekötés következtében az állatoknál tényleg kialakult a globális agyi ischaemia, három tényező támasztja alá: a pupilla kitágul, a pupilla reflex megszűnik; az állat a hátáról nem fordul vissza a hasára (righting reflex hiánya), és nem reagál fájdalom ingerre sem.

#### ***In vitro elektrofiziológia:***

Az elektrofiziológiai mérések három nappal (2VO) és tíz nappal (4VO) a kétoldali CCA leszorítása után történtek. Az állatok dekaptációját követően metszést ejtettünk a fejbőrön. Majd a koponyán egy sagittális és egy a két orbitát összekötő cornális metszést végeztünk. A koponyatetőt a bemetszések mentén szétnyitottuk, majd a bulbusok mögött és a kisagy előtt ejtett coronális metszésekkel eltávolítottuk az agy hippocampust tartalmazó régióját. Vibratómmal (Campden Instruments, Egyesült Királyság) 400  $\mu\text{m}$  vastagságú coronális metszésű szeleteket készítettünk a hippocampus középső részéből. A metszést jéghideg, 2-4 °C-os mesterséges cerebrospinalis folyadékban (artificial cerebrospinal fluid, aCSF) végeztük, melynek összetevői mM-ban megadva: 130 NaCl, 3,5 KCl, 1  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 24  $\text{NaHCO}_3$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\text{MgSO}_4$  és 10 D-glükóz. Mind a metszésnél, mind pedig a regisztrálás során alkalmazott aCSF-et karbogénnel (95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) oxigenáltattuk, hogy a szeletek  $\text{O}_2$  ellátása zavartalan legyen. A szeleteket egy Haas-típusú regisztráló kamrába helyeztük, majd ott szobahőmérsékleten inkubáltuk egy órán át, hogy a regisztráció közben használt oldatban pihenjenek. A regisztráló oldat összetétele csak a 3 mM  $\text{CaCl}_2$  és 1,5 mM  $\text{MgSO}_4$  koncentrációkban tért el a metszésnél használttól. A kamrában a perfúziós aCSF áramlási sebessége 1,5-2 ml/perc volt. A regisztrálások 34 °C-on, páradús környezetben zajlottak. Az ingerlő elektródnak egy bipoláris fém elektródot használtunk (A-M System, Sequim, WA, USA), amelyet a CA1 régió stratum radiatum rétegébe helyeztünk (10./A ábra). A

Schaffer-kollaterálisok orthodromikus ingerlése állandó áramerősség mellett, 0,2 ms-os impulzusokkal 0,033 Hz frekvencián történt.

A kiváltott posztszinaptikus mező potenciálok (field-evoked postsynaptic potencial, fEPSP 10./B ábra) regisztrálása a hippocampus CA1-es régiójában a stratum radiatum és a stratum pyramidale rétegekből történt (10./A ábra). A regisztrálás 1-2 M $\Omega$  ellenállású regisztráló aCSF-fel feltöltött mikroelektrodokkal zajlott. A teszt stimulus intenzitása úgy lett beállítva, hogy a szeletekben a már maximális amplitúdójú fEPSP-t kiváltó legkisebb impulzus intenzitásának körülbelül 50%-át váltsa ki (átlagosan 30-60  $\mu$ A között volt).



**10. ábra A:** Az *in vitro* elektrofiziológia kivitelezésének sematikus ábrája. Stim: ingerlő elektród, Rec1, 2: elvezető elektródák. **B:** Elvezetett fEPSP; a és b pontok között mértük az amplitúdók nagyságát

A fEPSP regisztrálása Digidata 1200 analóg-digital konverter használatával, pClamp6 és Axoscope10.1 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA) regisztráló rendszerrel ellátott számítógépen történt. Az elmentett adatok kiértékelését Axoscope10.1 és OriginPro 7.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) program segítségével végeztük.

A CA1 régió és Schaffer-kollaterálisok szinapszisaiban az LTP indukcióhoz használt nagy frekvenciás ingerlés (high frequency stimulation, HFS) során a 0,2 ms jelszélességű impulzusokat 100 Hz frekvenciával 5 másodpercig adtuk a teszt stimulus 100%-os intenzitásán. A HFS után a fEPSP amplitúdójának változásait 60 percen keresztül regisztráltuk. A HFS adása előtt a szeleteket 40-60 percen keresztül kontroll ingerlés (0,2 ms-os impulzusokkal 0,033 Hz frekvencián 20 másodpercenként) mellett pihentettük, amíg a fEPSP-k amplitúdója stabilizálódott, majd egy 10 perces kontroll szakasz felvétele következett. A kontroll periódus után végeztük az LTP indukciót.

A páros impulzus facilitáció (PPF) mérése az alap glutamáterg szinaptikus funkció vizsgálatára szolgál (Creager és mtsai., 1980; Zucker, 1989). A PPF mérése a teszt

stimulus intenzitásán történt 25, 50, 75 és 100 ms impulzusok közti időtartammal (interpulse intervals, IPI). A második kiváltott válasz amplitúdó értékét osztottuk az első ingerre adott válasz amplitúdó értékével, és az így kapott arányt ábrázoltuk. Az IO görbék (input-output, bement/kimenet) szintén az alapvető glutamáterg szinaptikus működés mérésére készültek, ahol a kontroll csoport és a 2VO csoport fEPSP amplitúdó értékeit ábrázoltuk különböző ingerlési áramerősségek mellett. Az ingerlő impulzust 0  $\mu$ A-tól 100  $\mu$ A-ig változtattuk.

Mindig maximum két szeletet vizsgáltunk egy állatból, és minden szeletet csak egyféle mérésnek vetettünk alá (LTP, IO, PPF).

### ***Szövettan:***

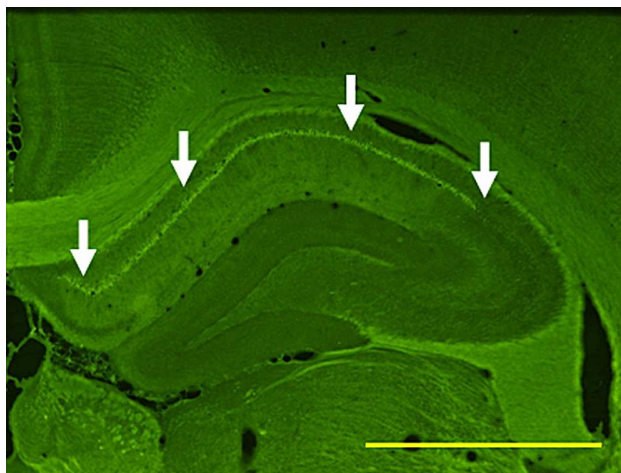
Mindkét kísérleti felállásban (2VO, 4VO) a szövettani vizsgálatok számára előkészített állatokat 4%-os paraformaldehid oldattal (0,1M foszfát pufferben oldva) transzkardiálisan perfundáltuk. A kivett agyakat további egy éjszakán át ugyanebben az oldatban utófixáltuk. Másnap az agyakat 24 órára 20%-os szacharóz oldatba helyeztük. Ezután fagyasztva metsző mikrotómmal 36  $\mu$ m vastag szeleteket metszettünk a hippocampus területéről (Frigomobil Modell 1206, Reichert-Jung, Nußloch, Németország). A metszeteket TBS – 4%-os TritonX oldatok keverékéből zselatinozott tárgylemezre húztuk fel. A megszáradt metszeteket festés után Fluoromount segítségével fedőlemezrel lefedtük. A Fluoro-JadeB és NeuN festéseket követően a jelölődött sejteket a számunkra kifejlesztett program segítségével számoltuk össze a hippocampus CA-1 régiójából random kiválasztott egy látótérnyi területéről. Az így kapott adatokat átszámoltuk 1mm<sup>2</sup> területegységre.

### ***Alkalmazott festési eljárások:***

#### ***Fluoro-Jade:***

Fluoro-JadeB (FJ-B) egy fluorokróm festék, amely a sérült neuronokat festi meg (Schmued és Hopkins, 2000a; Schmued és Hopkins, 2000b). A FJ-B nagyobb neuron specifitást biztosít, mint a hagyományos Fluoro-Jade. A szeleteinket etanol sorban dehidratáltuk, mielőtt 15 percre 0,06%-os kálium-permanganát oldatba helyeztük volna. Ezután desztillált vizes mosás következett, majd a szeleteket 30 percig 0,001%-os FJ-B (Chemicon) oldatba helyeztük. A festés után a metszeteket desztillált vízben lemostuk (3x1 perc), és egy napig sötétben, szabad levegőn száradni hagytuk. A metszeteket mikroszkóp alatt (BX51, Olympus, Tokió, Japán) vizsgáltuk. Az gerjesztő fény hullámhossza 470-490 nm, a kibocsátott fény hullámhossza 520 nm volt. A Fluoro-JadeB fluoreszcens technika

segítségével jól demonstrálhatók a 4VO következtében sérült sejtek a hippocampus CA1 régiójában (11. ábra).



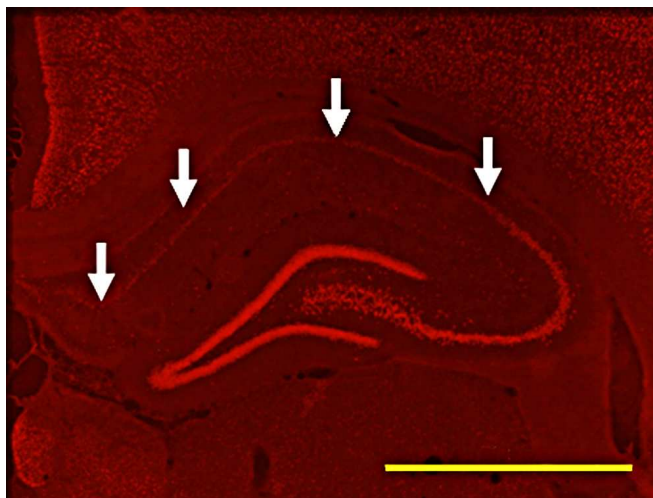
**11. ábra** Globális agyi ischaemiát követően Fluoro-JadeB festéssel jelölődött sérült neuronok a hippocampusban. A nyilak a CA1 régióban sérült sejtek területét jelzik. Kalibráció: 2 mm. (saját nem publikált adat)

#### *NeuN:*

A anti-neuronal nuclei (NeuN; neuronális magi antitest) egy specifikusan a differenciált idegsejteket jelölésére alkalmazott immunhisztokémiai módszer. Mi is ezt az eljárást alkalmaztuk az ép hippocampalis CA1 piramis sejtek jelölésére. A tárgylemezre felhúzott szeleteket TBS pufferben (0,15 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH: 7,4) 1 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. A puffer tartalmazott 0,3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t, hogy az endogén peroxidázt blokkoljuk. A nonspecifikus kötőhelyek telítésére 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten inkubálva a szeleteket TBS-NGS rendszert használtunk (a TBS tartalmazott 1% w/v NGS-t (normal goat serum, kecske szérum)). Ezután a szeleteket a primer antitesttel (1:2000 egér anti-NeuN TBS-NGS; Chemicon) egy éjszakán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A primer antitest közvetlenül kapcsolódik a NeuN-hez. Ezután háromszor 10 perces TBS mosás következett. Végül szekunder antitesttel (1:1000 Cy<sup>TM</sup>3-conjugated donkey anti-mouse IgG; Jackson ImmunoResearch) tettük láthatóvá a jelölendő komplexet. A metszetek szobahőmérsékleten 3 órán keresztül hagytuk a szekunder antitestet tartalmazó oldatban. Végül a metszeteket fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltuk meg. A gerjesztő fény hullámhossza 530-550 nm, a kibocsátott fény hullámhossza 590 nm volt. Az idézett irodalom és saját korábbi vizsgálataink (4VO modell) alapján a NeuN immunhisztokémia jó választásnak bizonyult az intakt sejtek



megjelenítésére a CA3-as régióban, és a gyrus dentatusban, valamint a CA1 területén is (12. ábra).



**12. ábra** Globális agyi ischaemiát követően NeuN festéssel jelölődött ép neuronok a hippocampusban. A nyilak a kiesett hippocampalis CA1 areát jelzik. Kalibráció: 2 mm. (saját nem publikált adat)

#### *Protein S-100 jelölés:*

A Protein S-100 egy a kalcium-kötő fehérjék nagy családjából. Humán cerebrovascularis megbetegedések esetén jelentős összefüggést mutattak ki a plazma S100 protein koncentrációja és a cerebrális infarktus térfogata között (Aurell és mtsai., 1991). Közismert, hogy az S100 protein szabályozza a kalcium függő sejtszignalizációt a neuronális differentációban és az apoptózis folyamataiban. Az asztrogliákban felszaporodó S100 fehérje kulcsszerepet játszhat az infarktus kiterjedésében (Matsui és mtsai., 2002; Asano és mtsai., 2005). Az S100-ról nemrég kimutatták, hogy a központi idegrendszeri sérülések ígéretes markere lehet (Martinez és mtsai., 1998; Ishiuchi és mtsai., 2007). Poliklonális nyúl antitestet szarvasmarha S100 proteinhez (anti-S-100) használtunk a 2VO hatására kialakuló S100 kapcsolt gliasejt eloszlás kimutatásához. A szeleteket egy éjszakán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az S100 protein elleni elsődleges antitesttel (1:10000 nyúl anti-szarvasmarha S100; Dako, Glostrup, Denmark), majd másodlagos antitesttel kezeltük (1:1000 Cy<sup>TM</sup>3-összekapcsolt számár anti-nyúl IgG; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd, UK) szobahőmérsékleten három órán keresztül. Végezetül a jelölődést fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk 530-550 nm hullámhosszú megvilágítással, és 590 nm-es kibocsájtott fény segítségével.

#### ***Krezil-ibolya:***

A *krezil-ibolya* (Sigma, Németország) jelölés 1%-os szűrt oldat használatával történt: a szeletek a következő összetételű oldatokban történő mosáson estek át (a megadott ideig): 95% etanol – 15 perc, 70% etanol – 1 perc, 50% etanol – 1 perc, desztillált víz – 2 perc, desztillált víz – 1 perc, krezil-ibolya festék – 5 perc, desztillált víz – 1 perc, 50% etanol – 1 perc, 70% etanol – 2 perc, 95% etanol – 2 perc, 95% etanol – néhány bemártás, 100% etanol – 1 perc.

#### ***Hatóanyag-beadás:***

A KYN-t (Sigma, Németország) (300 mg/kg, i.p.) és a PROB-et (200 mg/kg, i.p.) 4 napon keresztül kapták az állatok: az előkezelt csoportban az első KYN+PROB injekciót 2 órával a carotis okklúzió előtt kapták, majd 4 napon keresztül minden nap ugyanabban az időben kaptak egy-egy újabb kezelést. Az utókezelt csoport esetében az állatok az első kezelést a reperfúzió kezdetén kapták, majd a maradék négyet az előkezelt csoporttal megegyezően 4 napon keresztül.

Az OxAc-ot (Sigma, Németország) 0,2 M-os foszfát pufferben oldottuk fel, úgy hogy az oldat pH-ja 7,4 legyen. OxAc injekció végtérfogata 1,5 ml volt. A legmagasabb dózist az irodalom alapján választottuk ki (Gottlieb és mtsai., 2003; Teichberg és mtsai., 2008), 1,5 mmol, 2,7  $\mu$ mol, 1  $\mu$ mol, 0,1  $\mu$ mol állatonként, amelyek átlagosan 200 g tömegűek voltak. Az anyagot intravénásan juttattuk az állat vérkeringésébe a reperfúzió megkezdésekor (utókezelés). A 1,5 ml oldat beadása 30 percen át történt a farokvénán keresztül fecskendő és stopper segítségével (0,05 ml/min). A kontroll állatok a kezeltékkel megegyező térfogatú fiziológiás sóoldatot kaptak.

#### ***Alkalmazott statisztikai módszerek:***

##### ***2VO modell esetében alkalmazott statisztikai módszerek***

A fEPSP-k amplitúdóját a HFS előtti 10 perces kontroll szakaszhoz, mint 100%-hoz normalizáltuk. A  $P \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. Az adatok feltételezhetően nem mutattak normál eloszlást, és ezt a Levene-teszt alkalmazása sem támasztotta alá, ezért az *in vitro* elektrofiziológiai mérések adatainak statisztikai vizsgálatához két független mintán végzett nem-parametrikus tesztet (Mann-Whitney U-teszt) alkalmaztunk (16. ábra). A különböző koncentrációjú OxAc hatásának mérése során kapott adatok elemzésekor egy-utas ANOVA tesztet végeztünk Bonferroni *post hoc* teszt

alkalmazásával.  $P \leq 0,05$ , és  $P \leq 0,001$  értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. *4VO modell esetében alkalmazott statisztikai módszerek*

Az idegsejt-számolás eredményét az  $\text{átlag} \pm \text{S.E.M.}$  feltüntetésével ábrázoltuk, és az adatokon egy-utas ANOVA tesztet végeztünk Bonferroni *post hoc* teszt alkalmazásával. A  $P \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikáns különbségnek. Az elektrofiziológiai adatok (21. ábra) elemzése során a 2VO analízis leírásánál részletezett okok miatt itt is a két független mintán végzett nem-parametrikus tesztet (Mann-Whitney U-teszt) alkalmaztunk.  $P \leq 0,05$  értéket tekintettük szignifikáns különbségnek.

A statisztikai számításokat az SPSS9.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) program használatával végeztük.

## Eredmények:

### 4VO kísérletsorozat eredményei:

#### Hisztológia:

Azokban az állatokban, amelyek elszenvedték a 10 perces teljes agyi ischaemiás állapotot, jelentős neuronpusztulást figyeltünk meg 10 nappal a beavatkozás után az állatok mindkét oldali hippocampusának CA1-es régiójában.

A károsodást szenvedett terület több milliméteres kiterjedést mutatott anterior-posterior irányban a hippocampus teljes egészében. A hippocampus ischaemiára legérzékenyebb CA1 területén minden coronális metszeten számos Fluoro-JadeB festéssel jelölődött (FJ+) neuron volt látható, ellentétben az ischaemiára kevésbé érzékeny CA3-as régióval és a gyrus dentatussal, ahol nem volt számottevő jelölődés megfigyelhető (13./A ábra; 14./A ábra).

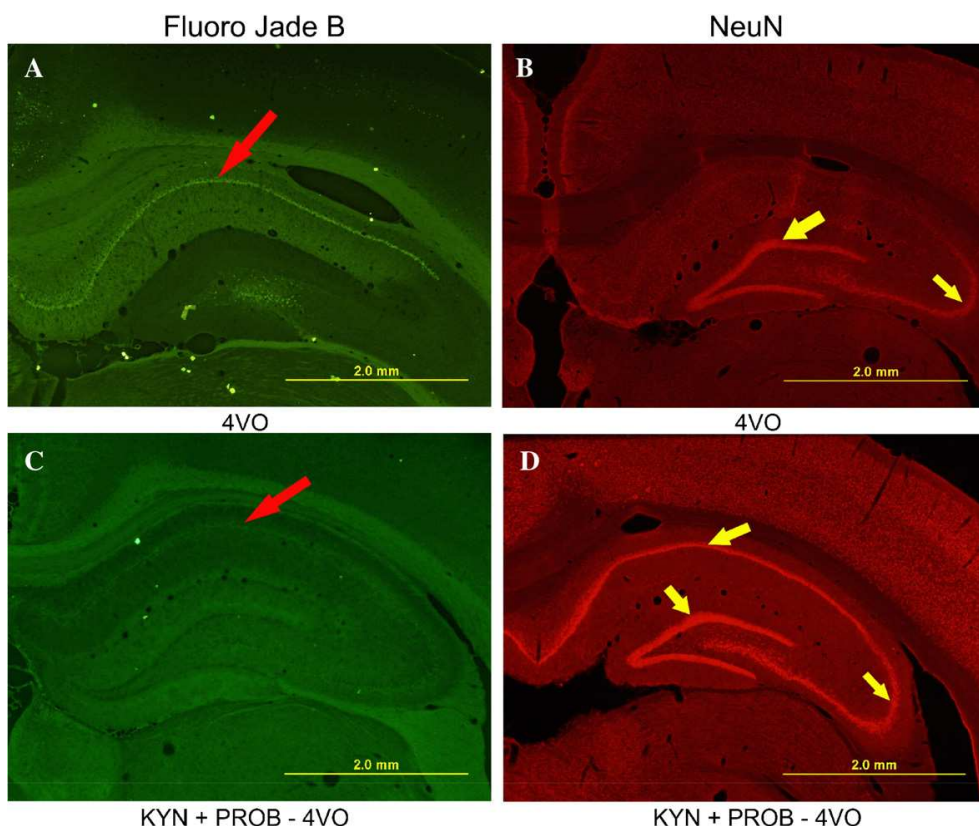
A FJ jelölődéssel arányban a NeuN immunhisztokémiával jelölődő – intakt – sejtek száma a CA1 régióban jelentősen lecsökkent a 4VO-n átesett állatok hippocampusából készült szeleteken. Ezzel szemben a CA3-as régió és a gyrus dentatus ugyanolyan mértékben festődött NeuN-nel, mint a kontroll állatcsoportból származó szeletek esetén (13./B ábra; 14./B ábra).

#### *Kinurenin kezelés hatása*

A KYN (300 mg/kg, i.p.) és a PROB (200 mg/kg, i.p.) előkezelésként való együttes alkalmazása jelentősen lecsökkentette a sérült neuronok számát. A kinurenin előkezelésben részesült állatok hippocampusában a FJ+ – sérült – neuronok a kontrollhoz képest csak elszórtan, kis számban jelentek meg (hasonlóan a CA3 és gyrus dentatus területekhez, 13./C ábra; 14./A ábra). A várakozásoknak megfelelően ezen eredménnyel teljesen egybevágó eredményt kaptunk a NeuN immunhisztokémiai jelöléssel, amely során a CA1-es area közel olyan képet mutatott, mint a CA3-as régió, vagy mint a kontroll csoport hippocampusának intakt CA1-es régiója (13./D ábra; 14./A ábra).

Elmondható tehát, hogy a KYN (+PROB) kezelés láthatóan csökkentette a CA1-es areában a 4VO okozta neuronsérülést, ám ez a változás csak akkor volt szignifikáns a kontroll ischaemiás beavatkozáshoz képest, ha a KYN kezelést a 4VO előtt elkezdtük, és utána 4 napig folytattuk (előkezelt csoport, KYN+PROB-4VO). Abban az esetben, amikor

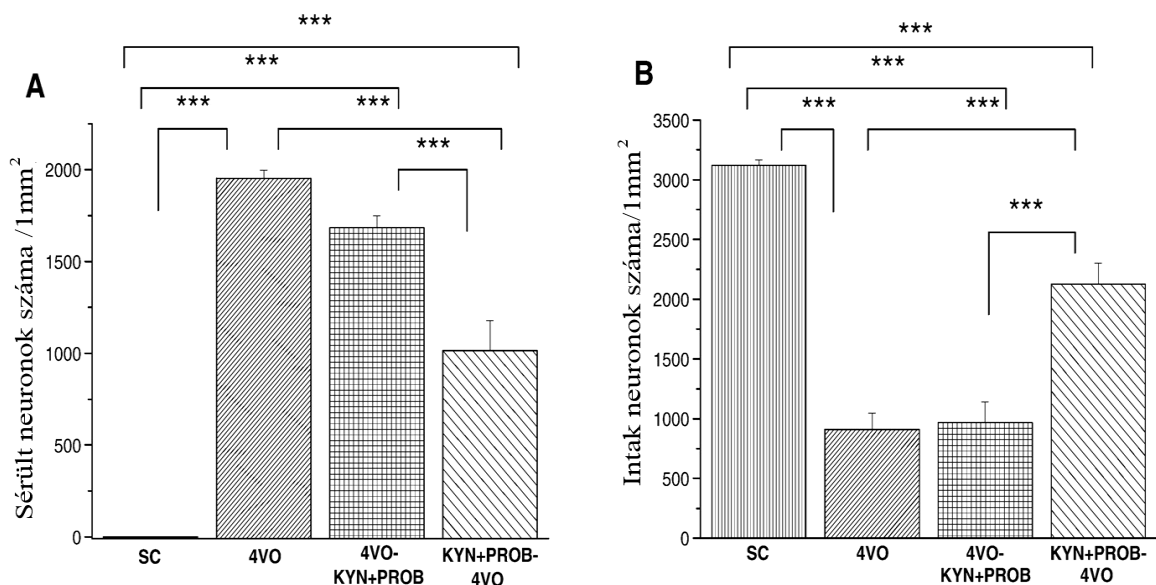
a KYN kezelés csak az ischaemiás periódus után kezdődött meg (utókezelt csoport, 4VO-KYN+PROB) hisztológiai képek majdnem teljes mértékben megegyeznek a nem kezelt ischaemiás csoport szövettani képeivel, ezért azokat nem mutatom be.



**13. ábra** A kinurenin kezelés hatása a 4VO okozta globális ischaemiás elváltozásra. **A** Átmeneti globális ischaemia okozta sejtpusztulás (piros nyíl mutatja a sérült CA1 régiót (FJ+)). **B** A CA3-as régió és a gyrus dentatus kevésbé érzékeny az átmeneti ischaemiára: NeuN-immunopozitív régió (sárga nyílak). **C** A KYN+PROB előkezelés (KYN+PROB-4VO) megvédi a hippocampus CA1-es régióját (piros nyíl) a 4VO okozta károsodástól (FJ+ sejtek száma lecsökken). **D** Az előkezelt állatokban a NeuN immunhisztokémiai jelölés mutatja a kezelés hatására a CA1 régióban lévő ép sejteket, hasonlóan a CA3 régióhoz és a gyrus dentatushoz (sárga nyílak).

Az utókezelt csoportban a KYN neuroprotektív hatása a számszerűsített adatokon megfigyelhető volt ugyan, de a sérült neuronok számának csökkenés ebben az esetben nem érte el a statisztikailag szignifikáns mértéket (14./A ábra).

Az előbbieken leírt eredményekkel összhangban áll a NeuN festés eredménye: a nem sérült – intakt – sejtek száma az álműtött kontroll csoportban volt a legmagasabb, és ahogy várható volt, a 4VO csoportban a legalacsonyabb. A KYN utókezelés (4VO-KYN+PROB) alig volt hatásos, kicsit, nem szignifikáns mértékben növelte meg a NeuN festéssel jelölődött sejtek számát a 4VO csoportéhoz képest. Ezzel szemben, a KYN+PROB előkezelés hatására az ép sejtek száma összevethető mértékű volt a kontroll csoport eredményével, szignifikáns sejtszám növekedést tapasztaltunk az ischaemiás csoportéhoz képest (14./B ábra).



**14. ábra** A globális agyi ischaemia és a két eltérő kinurenin (KYN) kezelés hatására FluoroJadeB (A) és NeuN (B) festéssel jelölődő sejtek száma a hippocampus CA1-es régiójában sejtszám/mm<sup>2</sup>-ben ábrázolva  
**A** A FJ+ sejtek (sérült sejtek) számának alakulása az álműtött (SC), a globális ischaemián (4VO) átesett, az utókezelt (4VO-KYA+PROB) és az előkezelt (KYN+PROB-4VO) csoportokban.  
**B** A NeuN immunhisztokémiával jelölődő (intakt neuronok) számának alakulása az álműtött (SC), a globális ischaemián (4VO) átesett, az utókezelt (4VO-KYA+PROB) és az előkezelt (KYN+PROB-4VO) csoportokban. Az oszlopok a csoportokban kapott számértékek átlagát±S.E.M ábrázolja (N=6-7/csoport).  
 A \*\*\* jelölés a csoportok közötti szignifikáns különbséget jelöli p≤0,001 érték esetén (egy-utas ANOVA, Bonferroni post-hoc teszt).

Összefoglalva: KYN+PROB előkezelés képes volt jelentős mértékben (~58%) lecsökkenteni a 4VO hatására kialakult sejtkárosodás mértékét, míg csupán a 4VO utáni KYN+PROB utókezelés nem volt túlságosan hatásos, mivel csak 24%-os FJ+ sejtszám csökkenést eredményezett, amely változás nem volt szignifikáns (1. táblázat).

**1. táblázat** A sérült és intakt neuronok számának csoportok szerinti eloszlása a hippocampus CA1 régiójában.

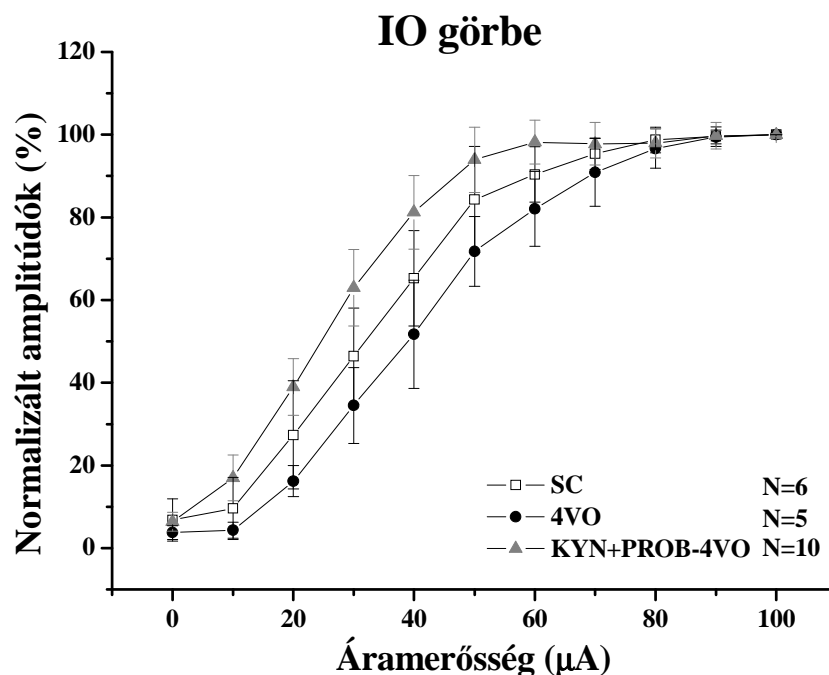
Csoportok	Fluoro-JadeB + (%)	NeuN-jelölődés (%)
SC	0	100
4VO	100	29.19
4VO-KYN+PROB	86.29	31.02
KYN+PROB-4VO	51.96	68.17

### ***In vitro* elektrofiziológia:**

Elektrofiziológiai kísérleteinkben már csak a hisztológiai vizsgálatok során hatásosnak bizonyult előkezelés csoportot vittük tovább, és hasonlítottuk össze az álműtött kontroll csoport valamint a 4VO csoport eredményeivel.

Mindenek előtt a Schaffer-kollaterális-CA1 szinapszisok alapvető szinaptikus jeltovábbítását vizsgáltuk meg, azaz hogy a szinaptikus plaszticitás csökkenését nem a Schaffer-kollaterálisok és a CA1 régió közötti szinapszisok transzmisszióromlása okozza-e (15. ábra).

Az IO görbék – ahol a kontroll csoport és a 4VO csoport fEPSP amplitúdó értékeit ábrázoltuk a különböző ingerlési áramerősségek (0-100  $\mu$ A) függvényében – eredményéből az látszik, hogy a 4VO csoport esetében az IO görbe a kontroll görbe alatt fut, a KYN kezelt csoport görbéje pedig a kontroll felett, de egyik eltérés sem érte el a szignifikancia szintjét. Elmondható tehát, az alap szinaptikus funkciók nem sérültek a 4VO hatására.

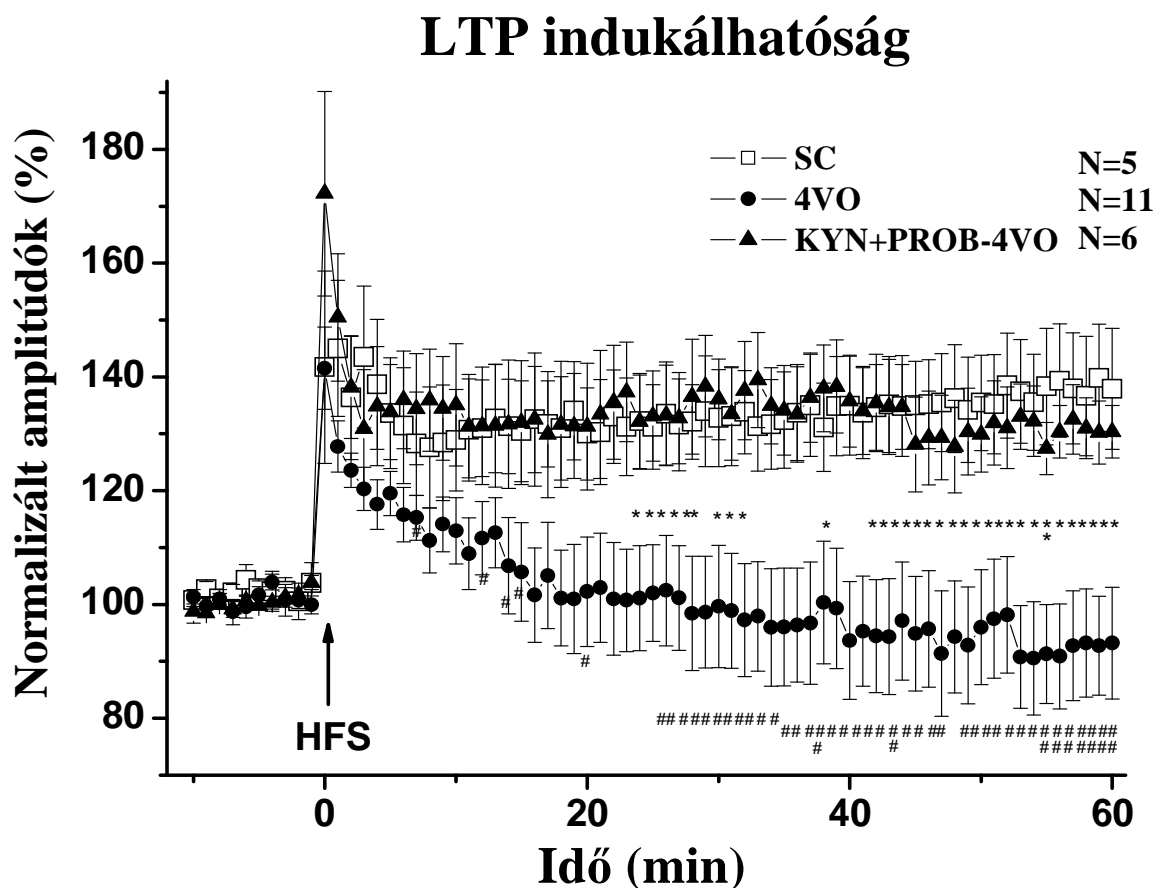


**15. ábra** IO görbék, az álműtött kontroll (SC) csoport, a globális ischaemiás (4VO) csoport és az előkezelésen átesett (KYN+PROB-4VO) csoport fEPSP amplitúdó értékeit mutatja különböző nagyságú ingerlési áramok függvényében (0-tól 100  $\mu$ A-ig). Szignifikáns különbséget nem találtunk a 3 csoport között.

Mivel az IO görbék szintjén tapasztalt különbségek nem voltak szignifikánsak, megállapíthatjuk, hogy az alap szinaptikus működést nem érintette lényegesen a tranziens globális ischaemia.

Az LTP indukciója ebben a kísérletsorozatban is a Schaffer kollaterális-CA1 piramis sejt szinapszisokban történt.

Az álműtött kontroll csoportban a HFS egy erőteljes növekedést okozott a fEPSP amplitúdójában (135-140%), amely növekedés tartósan meg is maradt az egy órás regisztrációs periódus végéig (16. ábra).



**16. ábra** Az átmeneti globális ischaemia (4VO) és a KYN előkezelés hatékonysága az LTP kiválthatóságára. A grafikonon minden pont az adott csoportban mért értékek átlagát $\pm$ S.E.M. mutatja, a kontroll szakaszhoz normalizálva (%-osan) az idő függvényében. A statisztikailag szignifikáns különbségeket a \*, # jelöli. Szignifikáns különbség a SC és a 4VO csoport között: \* $p<0,05$ , a kezelt és a 4VO csoport között # $p<0,05$ . Statisztikai analízishez két független mintán végzett nem-parametrikus tesztet (Mann-Whitney U-teszt) alkalmaztunk.

Azonos körülmények között, azonos ingerlési protokoll sokkal kisebb amplitúdó-növekedést eredményezett a 4VO csoport állataiból származó szeletek esetében, mint ami a kontroll esetében tapasztalható. Az amplitúdó-növekedés tartóssága is jelentősen kisebb mértékű volt, mivel a HFS-t követő 18-20. perc környékén a kontroll amplitúdó értékek szintjére csökkentek vissza amplitúdók, és nem volt LTP megfigyelhető. A regisztrációs 1 óra végére számos esetben a kiindulási amplitúdók nagysága alá csökkentek vissza a regisztrált fEPSP amplitúdói (16. ábra).

A KYN+PROB kezelést kapott állatokból készült szeletek esetében a HSF hatására a kontroll csoport eredményeihez hasonló mértékű amplitúdó-növekedést tapasztaltunk és

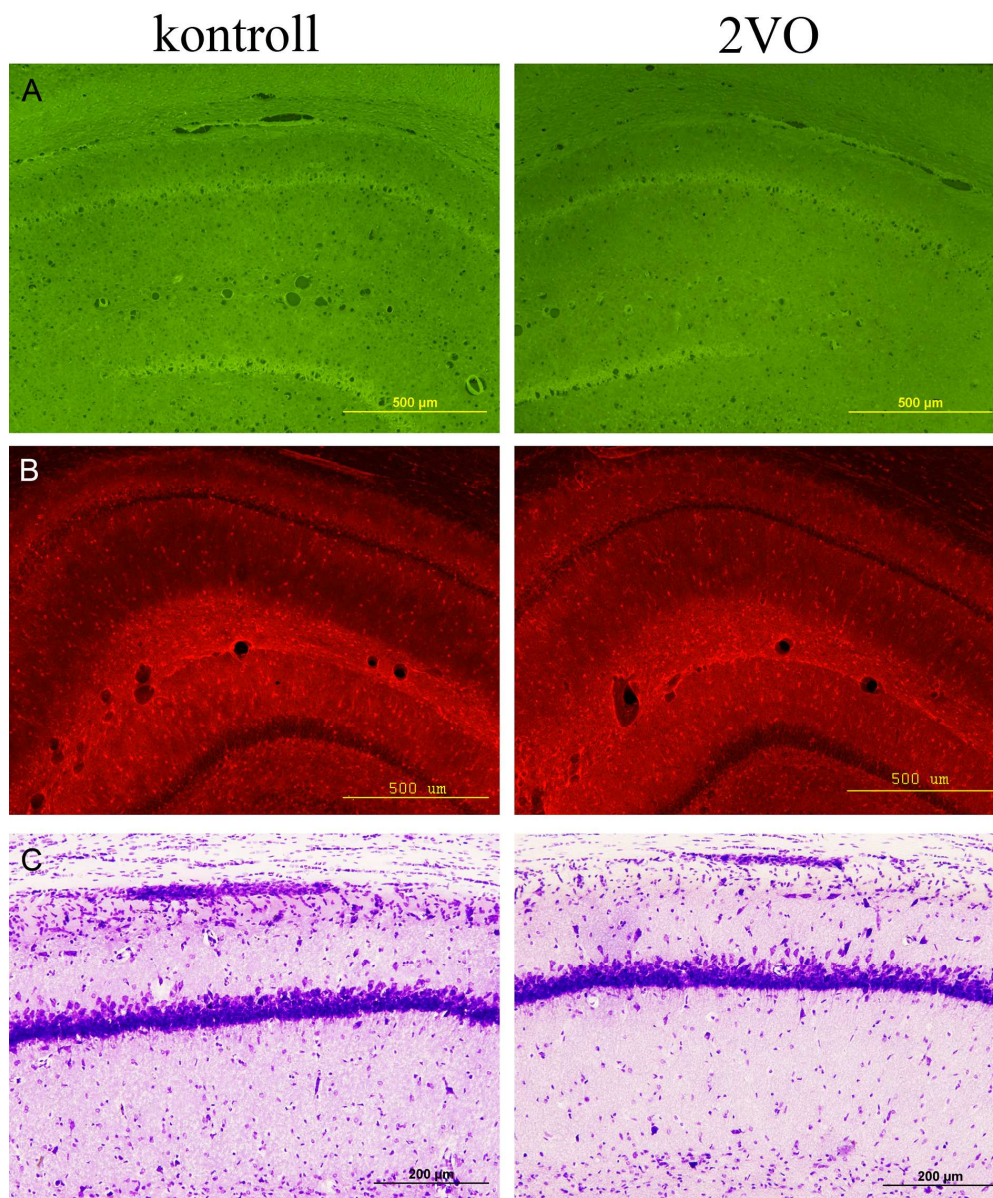


az amplitúdó-növekedés tartóssága is megegyezett a kontroll csoportéval. Kijelenthető, hogy a KYN+PROB kezelés megakadályozta a 4VO okozta LTP indukálhatóságának romlását.

## 2VO kísérletsorozat eredményei:

### Hisztológiai vizsgálat:

3 nappal az átmeneti agyi hipoperfúzió után az agyszeletek szövettani elemzése nem mutatott semmilyen változást a hippocampus CA1-es régiójában. Három nappal az átmeneti 2VO okozta hipoperfúzió sem a Fluoro-JadeB festés, sem az S-100 immunhisztokémia, sem a krezil-ibolya festés esetében nem volt sérülés/változás kimutatható a kontroll csoportból származó metszetekhez képest (17. ábra).

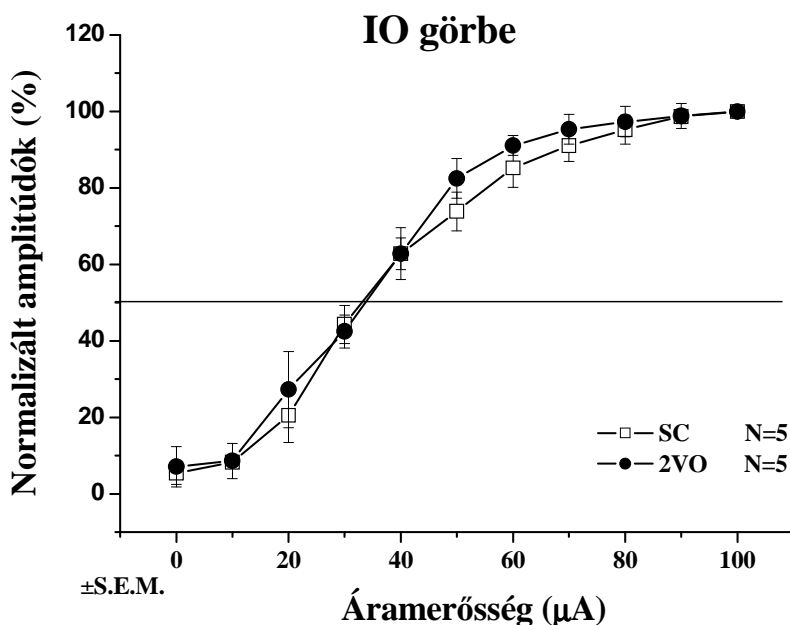


**17. ábra** Reprezentatív fényképek a hippocampus CA1 régiójából. Jobb oldalon a kontroll csoportból származó metszetek, a bal oldalon 2VO csoportból származó metszetek fényképei. **A:** Fluoro-JadeB; **B:** S-100; **C:** krezil-ibolya festések.

## Elektrofiziológia:

### Az alapvető szinaptikus jeltovábbítás vizsgálata:

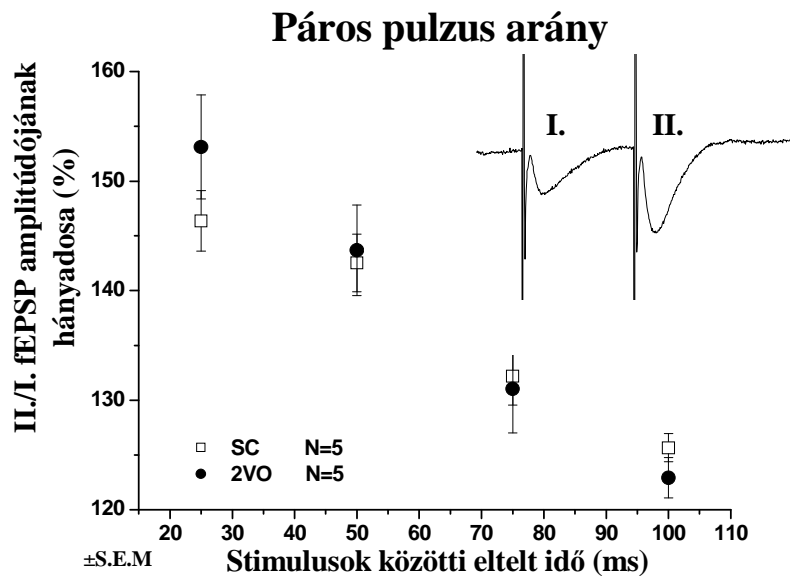
Megvizsgáltuk, hogy a 2VO okozta tranziens hipoperfúzió milyen mértékben befolyásolja az alapvető szinaptikus jeltovábbítást, azaz hogy a szinaptikus plaszticitás csökkenését nem a Schaffer-kollaterálisok és a CA1 régió piramis sejtjei közötti szinapszisokban fellépő transzmisszió romlása okozta. Az IO görbék – ahol a kontroll csoport és a 2VO csoport fEPSP amplitúdó értékeit ábrázoltuk a különböző ingerlési áramerősségek függvényében – eredményéből az a következtetés vonható le, hogy nincs jelentős eltérés a kontroll csoport és a 2VO csoport görbéi között, vagyis a kétoldali carotis communisok lezárításából adódó nem teljes agyi ischaemia nem okoz kárt a hippocampus CA1 régió alap szinaptikus működésében (18. ábra).



18. ábra Az IO görbék a kontroll csoport (SC) és a 2VO csoport fEPSP amplitúdó értékeit mutatják különböző nagyságú ingerlési áramerősségek függvényében.

### A preszinaptikus transzmitter-felszabadulás vizsgálata:

Annak érdekében, hogy a preszinaptikus transzmitter-felszabadulás esetleges csökkenését kizárhassuk, páros impulzus facilitációt mértünk különböző IPI-vel, 25, 50, 75 és 100 ms eltéréssel mind a kontroll, mind a 2VO csoportban. A PPF vizsgálatának eredménye azt mutatja, hogy a hipoperfúzió nem csökkentette a preszinaptikus glutamát felszabadulás határfokát. Ahogyan azt a 19. ábra is mutatja, nem volt szignifikáns különbség a két csoport adatai között.



**19. ábra** A preszinaptikus transzmitter-felszabadulás vizsgálat páros impulzus paradigmával a kontroll (SC) és a és a hipoperfúziós (2VO) csoportban. A második válasz és az első válasz amplitúdójának arányát (%-ban) ábrázoltuk a két impulzus közötti idő függvényében (25-100ms).

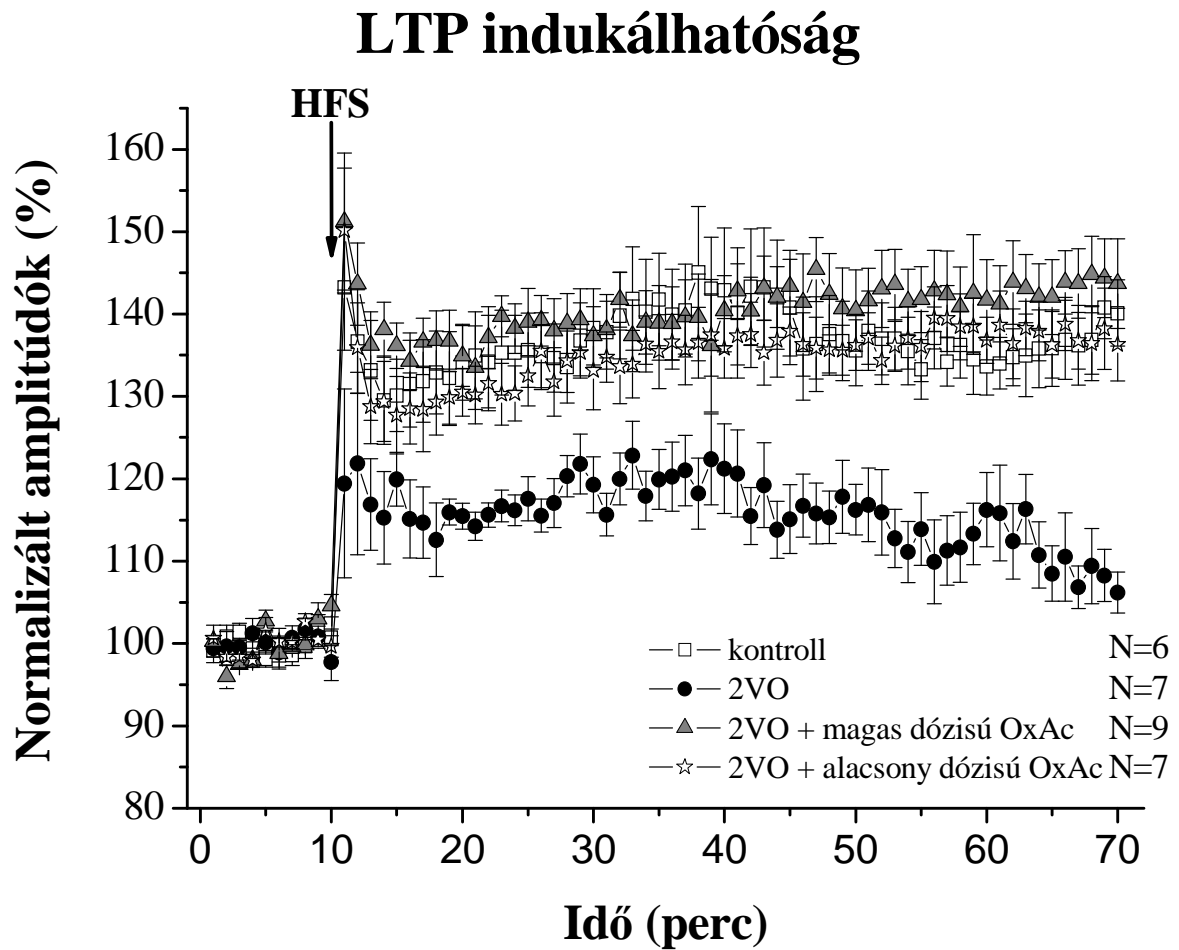
#### Az LTP kiválthatóság vizsgálat:

A nagyfrekvenciás ingerlés hatására jelentős fEPSP amplitúdó-növekedés (35-40%) történt az álműtött kontroll csoportban (16. ábra). Ez az amplitúdó-növekedés tartósan megmaradt az 1 órás regisztrációs periódus végéig (1. táblázat).

Azonos LTP ingerlési protokoll alkalmazása eredményeképpen 3 nappal a reperfúzió kezdete után szignifikánsan kisebb fEPSP amplitúdó-növekedést eredményezett a 2VO – a hipoperfúzió átesett – csoportban. Ebben a csoportban a HFS maximálisan kb. 20%-os amplitúdó-növekedést eredményezett. Az amplitúdó-növekedés tartóssága is jelentősen csökkent. Az amplitúdók a 20%-os növekedést mintegy 30 percen keresztül tartották meg, utána tartós csökkenésbe kezdtek. A regisztrációs periódus végére az amplitúdó értékek a kontroll szint közelébe estek vissza (107-108%, 16. ábra, 1. táblázat).

Az oxálecetsav hatását a 2VO okozta LTP indukálhatóság-csökkenésre olyan állatokból származó hippocampus szeleteken vizsgáltuk, amely állatok a carotis leztorítás után a reperfúzió kezdetén különböző koncentrációjú intravénás oxálecetsav injekciót kaptak. A hipoperfúziót követően alkalmazott 1,5 mmol-os és a 2,7  $\mu$ mol-os koncentrációjú oxálecetsav kezelésén átesett csoportokban az LTP indukcióra kapott fEPSP amplitúdó-növekedés a kontroll csoportban tapasztalt mértékű volt, és tartóssága sem különbözött az álműtött csoporthoz viszonyítva. Az egy órás regisztrálási idő végén az amplitúdó értékek a kontroll csoportban tapasztalt 135-140%-os növekedést mutatták (20. ábra).

A kontroll és a 1,5 mmol OxAc-at kapott csoport adatait összehasonlítva a hipoperfúziós (2VO) csoport adataival szignifikáns különbség mutatkozik a nagyfrekvenciás ingerlést követő hetedik perctől kezdve, és ez a szignifikáns különbség meg is maradt a regisztrálás végéig. A 1,5 mmol-os OxAc kezelt csoport és a kezelés nélküli 2VO-s csoport közötti szignifikáns különbség kis idővel később (HFS utáni 15. perc) jelent meg, ám itt is megmaradt a regisztráció végéig (2. táblázat).

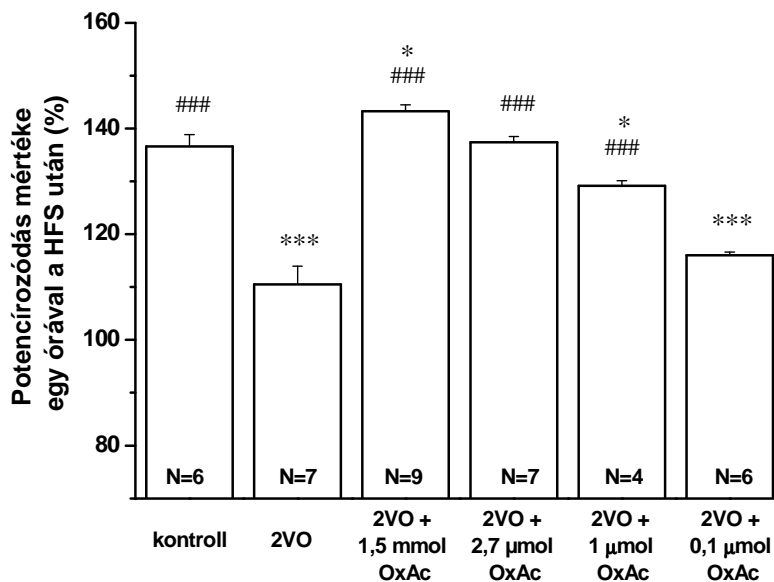


**16. ábra** LTP kiválthatóságának vizsgálata kontroll (N=6), 2VO (N=7) és két hipoperfúzió átesett eltérő koncentrációjú OxAc kezelést kapó csoportban (N=6 és N=7). Az OxAc kezelés a reperfúzió kezdetével egy időben történt. LTP indukció 10 perc kontroll szakasz felvételét követően történt nagyfrekvenciás ingerléssel (HFS; 500 pulzus 100 Hz-en). A kezelt csoportokban alkalmazott OxAc dózisok: magas dózis – 1,5 mmol, alacsony dózis – 2,7  $\mu$ mol. Minden adatpont több független mérés során regisztrált fEPSP-k amplitúdójának átlagát mutatja a kontroll szakaszhoz, mint 100%-hoz normalizálva.

**2. táblázat** A facilitáció mértéke (1-60 perc) a kontroll szakaszhoz normalizálva (%). <sup>a</sup>P<0,05, <sup>b</sup>P<0,01 szignifikáns különbség a hipoperfúziós (2VO) csoporttól; ± S.E.M.

A facilitáció mértéke (1-60 perc) a kontroll szakaszhoz normalizálva (%)				
Idő (perc)	SHAM	2VO	2VO+ (1,5 mmol) OxAc	2VO+ (2,7 μmol) OxAc
Kontroll 20. perc	100.0±0.4	100.3±0.2	100.3±0.7	99.9±0.5
1	143.2±7	119.4±11	151.2±8	150.2±7
5	130.1±4	119.9±3	136.2±2	127.7±4
10	134.2±4 <sup>b</sup>	115.5±1	134.9±3 <sup>b</sup>	130.5±2
15	135.6±4 <sup>b</sup>	117.6±2	139.0±4 <sup>b</sup>	132.5±3 <sup>a</sup>
20	138.3±4 <sup>a</sup>	119.3±3	137.4±3 <sup>a</sup>	133.2±4
25	141.8±5 <sup>a</sup>	119.9±3	138.9±4 <sup>a</sup>	135.5±4 <sup>a</sup>
30	142.9±7 <sup>a</sup>	121.2±5	140.4±4 <sup>a</sup>	135.8±3 <sup>a</sup>
35	140.8±6 <sup>b</sup>	115.1±4	143.4±3 <sup>b</sup>	137.9±2 <sup>b</sup>
40	135.6±4 <sup>a</sup>	116.3±3	140.4±4 <sup>b</sup>	136.2±3 <sup>b</sup>
45	133.3±3 <sup>a</sup>	113.9±4	141.8±3 <sup>b</sup>	136.1±4 <sup>b</sup>
50	133.7±3 <sup>b</sup>	116.2±4	141.7±4 <sup>b</sup>	136.8±2 <sup>b</sup>
55	135.8±4 <sup>b</sup>	108.5±3	142.1±4 <sup>b</sup>	136.3±4 <sup>b</sup>
60	140.1±4 <sup>b</sup>	106.2±2	143.7±5 <sup>b</sup>	136.3±7 <sup>b</sup>

Végül megvizsgáltuk az oxálecetsav protektív hatásának dózisfüggését. A korábban leírt protokoll szerint történt a 2VO, az oxálecetsav kezelés és az *in vitro* elektrofiziológiai mérés. A HFS előtti kontroll periódus utolsó 10 percének adatait hasonlítottuk össze az LTP indukció utáni 50-60. perc adataival. Maximális protektív hatással az 1,5 mmol-os és a 2,7 μmol-os dózis bírt. A 0,1 μmol-os dózis nem volt képes szignifikáns javulást elérni a 2VO csoporthoz képest (17. ábra).



**17. ábra** A poszt-ischaemiás OxAc kezelés hatékonyságának dózis-függése. Az oszlopok a nagyfrekvenciás ingerlés (HFS) után bekövetkező amplitúdó-változás mértékét mutatják a HFS utáni 50-60. perc között a kontroll szakaszhoz normalizálva. A normalizálásnál a kontroll szakasz átlagát tekintettük 100%-nak. Minden oszlop több független mérés (N) adatainak átlagát±S.E.M. ábrázoltuk. A feltüntetett koncentráció értékek a ténylegesen beadott anyagmennyiséget jelölik állatonként.

\* $P \leq 0,05$ , \*\*\* $P \leq 0,001$  értékek esetén szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz képest; ### $P \leq 0,001$  értékek esetén szignifikáns különbség a 2VO csoporthoz képest; (egy-utas ANOVA, Bonferroni *post hoc* teszt).

## Megbeszélés:

Az agyban a leggyakrabban kialakuló károsodás ischaemiás vagy hypoxiás jellegű, ami elsősorban az idegsejtek károsodásával, pusztulásával jár. A központi idegrendszer az energiaháztartásának fenntartása érdekében a fiziológiás működés során a fő szubsztrátokból (oxigén, glükóz, ATP) állandó ellátást igényel. Az agyi véráramlás csökkenésének bizonyos mértékénél a neuronok ATP szintjének csökkenése figyelhető meg. A hosszútávon fennálló véráramlás csökkenés következtében kialakuló hypoxia glükóz-lebontást indukál energia krízist okozva a neuronokban (Pulsinelli és mtsai., 1982; Beck és mtsai., 1995; Derdeyn és mtsai., 1999). A lecsökkent ATP-szint kimozdítja az érintett területen található idegsejteket az anti- és proapoptotikus egyensúlyból, és az apoptózis felé indítja el sejteket. Amennyiben a hypoxiát követően az ATP-hiány átlép egy kritikus mértéket, akkor már nem apoptózis, hanem nekrosis következik be (Nicotera és mtsai., 2000). A lecsökkent ATP-szint következtében kialakuló energiazavar hatására a plazmamembránok  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -pumpa működésében is zavar keletkezik, felborul a sejtek ionhomeosztázisa. A membránok a feszültség-függő  $\text{Na}^+$ -csatornákon keresztül és egyéb úton történő  $\text{Na}^+$ -beáramlásnak hatására depolarizálódnak (Leigh és Meldrum, 1996), ezáltal a serkentő hatású Glu felszabadulása fokozódik, illetve a Glu sejtekbe történő  $\text{Na}^+$ -függő visszavétele is zavart szenved. Ez maga után vonja a feszültségfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák aktiválódását, ami által a  $\text{Ca}^{2+}$  sejtekbe történő beáramlása megnő. Hosszantartó vagy súlyos ischaemiás állapotokban az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  mennyiségének szabályozása erősen károsodik. A fokozott  $\text{Ca}^{2+}$ -beáramlás miatt a serkentő glutamát felszabadulása tovább fokozódik, ami a sejtek glutamát receptorainak aktivációja útján újabb direkt és indirekt  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlást okoz. Ezen felül két intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktár is kinyílik: az endoplazmatikus retikulum és a mitokondrium (White és mtsai., 2000). Az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint növekedés hatására további Glu felszabadulás következik be az axon-terminálisokban. A fokozott Glu felszabadulás hatására megváltozik a környező sejtek működése, és ezzel az ischaemiás esemény hatásai szöveti szintre emelkednek (White és mtsai., 2000).

A neuroprotekciónak stratégiák az ischaemia/hypoxia hatására kialakuló károsodások megelőzésére/csökkentésére irányulnak. Az ischaemiás eseménysor hatására kialakuló folyamatok pontos időbeli behatárolása nagyon fontos a hatásos terápia megtervezése érdekében. A fentebb leírt folyamatok közül a glutamát excitotoxicitás, a  $\text{Ca}^{2+}$



intracelluláris felhalmozódása és az oxigén szabadgyökök keletkezése (korai károsodások) az ischaemiás periódus után nagyon rövid időn belül (percek) megtörténik. A károsodott szövet sejtjeinek apoptózisa és az ezzel egyidőben kialakuló gyulladásos folyamatok (késői károsodások) megindulása órákkal az ischaemiás periódus után kezdődik meg, és lefolyásuk az ischaemia mértékétől függően napokig, hetekig tarthat (Dirnagl és mtsai., 2003).

Az ischaemiás neuronpusztulás patomechanizmusának mind jobb ismerete kiszélesítette a lehetséges neuroprotekcióna irányuló terápiás próbálkozások számát (Lyden és Wahlgren, 2000; White és mtsai., 2000). Az ischaemiás események hatására kialakuló változások számos neuroprotektív támadáspontot nyújtanak. Az azonban a fentebb leírtak alapján is jól látszik, hogy a  $\text{Ca}^{2+}$  túlzottan nagymértékű beáramlása a sejtekbe a sejthalálhoz vezető egyik legfőbb esemény (Hou és MacManus, 2002). Agyat érintő ischaemiában a  $\text{Ca}^{2+}$  sejtbe történő bejutása a feszültségfüggő és/vagy ligandfüggő (pl.: NMDA) ioncsatornákon keresztül lehetséges.

Az NMDA-receptorok részleges blokkolása lehet a közvetlen idegsejt megmentő neuroprotektív beavatkozások elsődleges célpontja. Számos kompetitív és nem kompetitív NMDA-receptor antagonistát kipróbáltak már, mint lehetséges neuroprotektív szert ( $\text{Mg}^{2+}$ , *dizolcipin*, *memantin*, *eliprodil*), de a klinikai vizsgálatok során egyik sem váltotta be a hozzá fűzött reményeket (Giroux és mtsai., 1994; Stieg és mtsai., 1999; Clark és mtsai., 2000; Gorgulu és mtsai., 2000; Warach és mtsai., 2006). Hatásos vegyületek lehetnek az endogén *kinurénsav* (KYNA) és származékai, valamint a kinurénsav előanyaga az *L-kinurenin* (L-KYN), amelyek nemcsak a stroke, hanem egyéb neurológiai kórképek esetén is potenciális neuroprotektív szerként működhetnek (Salvati és mtsai., 1999; Nemeth és mtsai., 2004; Robotka és mtsai., 2005; Gigler és mtsai., 2007; Sas és mtsai., 2008).

Az L-KYN és a KYNA a triptofán anyagcsere során keletkező neuroaktív tulajdonsággal rendelkező termékek (Ellinger, 1904; Homer, 1914). A KYNA-ról tudott, hogy több receptor működését is befolyásolja, széles spektrumú serkentő aminosav receptor antagonista, amely kis koncentrációban kompetitív NMDA receptor antagonistaként működik. (Birch és mtsai., 1988; Kessler és mtsai., 1989), nagyobb koncentrációban kompetitív antagonistája az AMPA és kainát receptoroknak, valamint a képes preszinaptikusan blokkolni a nikotinos acetilkolin receptorokat is (Stone és Connick, 1985; Bertolino és mtsai., 1989; Kessler és mtsai., 1989). A KYNA neuroprotektív szerként való alkalmazását gátolja az a tény, hogy a KYNA nem vagy igen csekély mértékben képes

átjutni a vér-agy gáton (Fukui és mtsai., 1991). Lehetséges neuroprotektív beavatkozás lehet az, ha a kinurenin útvonal enzimatikus lépéseibe avatkozunk be, úgy hogy a KYNA képződés irányába toljuk el a reakciókat (Perkins és Stone, 1982; Swartz és mtsai., 1990), vagy ha az L-KYN-t a KYNA előanyagát alkalmazzuk, amely képes átjutni a vér-agy gáton és az agyszövetben KYNA-vá alakulni (Fukui és mtsai., 1991). Vécsei és munkatársai leírták (1992), hogy a szisztémásan adott L-KYN dózis-függő módon emeli az agy KYNA szintjét. A normál agyi nanomólos KYNA koncentráció (Moroni és mtsai., 1988) 1000-1300-szorosára növelhető perifériásan alkalmazott KYN és PROB együttes adásával (Miller és mtsai., 1992). Már több esetben leírták a perifériásan adott KYN központi idegrendszerben kifejtett neuroprotektív hatását (Nozaki és Beal, 1992; Cozzi és mtsai., 1999). Kutatócsoportunk is igen biztató eredményeket ért el a KYN, mint neuroprotektív szer vizsgálata során. A perifériás KYN kezelés képes volt megakadályozni a pentiléntetrazol által indukált generalizált klónusos-tónusos görcsöket elektrofiziológiai és magatartásvizsgálatokban egyaránt (Nemeth és mtsai., 2004). Ezen munka eredményeit és tapasztalatait (KYN, PROB koncentrációk; kezelés típusa – i.p.) felhasználva munkánk első felében azt a feltételezésünket próbáltuk igazolni, miszerint átmeneti globális ischaemia (transient ischaemic attack, TIA) esetén a perifériásan alkalmazott KYN(+PROB) szintén neuroprotektív hatást fejt ki a központi idegrendszerben. A PROB egy jól ismert szerves sav transzporter gátló (Moroni, 1999), amely segít a beadott KYN hatására megnövekedett KYNA szint fenntartásában.

Szövetteni kísérleteink eredményei és az irodalmi adatok azt mutatják (Burda és mtsai., 2005), hogy a globális ischaemia hatására az agy hypoxiára legérzékenyebb területén, azaz a hippocampus CA1-es régiójában drasztikus mértékű idegsejtkárosodás tapasztalható. Igaz, hogy a károsodás megjelenítésére használt FJ-B festés nem tesz különbséget az apoptotizáló és nekrotizáló sejtek között, az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a FJ-B alkalmas festési eljárás az ischaemia okozta idegsejtkárosodás jelölésére (Burda és mtsai., 2005). Kísérleteink során két eltérő kezelést alkalmaztunk. Az egyik csoportban az állatok a 4VO után a reperfúzió kezdetén kapták meg az első adag KYN+PROB-et (utókezelés), a másik kezelt csoport állatai a globális ischaemia előtt megkapták az első kezelést (előkezelés). Az ischaemiás kontroll csoport hisztológiai eredményi hozták a várt eredményt. Drasztikus méretű neuronkárosodást figyeltünk meg a hippocampus CA1-es területén. A TIA után négy napon keresztül perifériásan alkalmazott KYN+PROB kezelés kis mértékben csökkentette a neuronpusztulást, de ez a javulás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Az agy kérgi területein a KYN+PPROB utókezelés is szignifikáns

mértékben volt hatékony (Robotka és mtsai., 2008). Ha azonban a TIA előtt elkezdődött a kezelés, ami további négy napig folytatódott, akkor ez képes volt jelentős mértékben (~58%) lecsökkenteni a hippocampusban a 4VO hatására kialakult sejtpusztulás mértékét. Elektrofiziológiai kísérleteinkben már csak a hisztológiai vizsgálatok során hatásosnak bizonyult csoportot vittük tovább. Kontroll állatok esetében a nagyfrekvenciás ingerlés hatására kialakult az LTP. Tíz nappal a TIA után megvizsgálva a hippocampus funkcionális állapotát azt tapasztaltuk, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően (Gillardon és mtsai., 1999; Li és mtsai., 2006) a hosszantartó szinaptikus plaszticitás – így az LTP is – kialakulása és fenntartása is zavart szenved. Az előkezelt csoportban az LTP kiválthatósága nem különbözött a kontroll csoport eredményétől. Kijelenthető tehát az, hogy a KYN+PROB előkezelés lecsökkentette a 4VO által kiváltott ischaemia okozta neuronpusztulást a hippocampus CA1-es régiójában, és megakadályozta a hosszútávú szinaptikus plaszticitás indukálhatóságának romlását. Tehát minden bizonnyal elmondható, hogy a perifériásan alkalmazott KYN bejutott az agyba, ahol a kinurénsav-transzamináz (KAT) enzim hatására az asztrocitákban transzaminálódik neuroprotektív hatású KYNA-vá (Bender és McCreanor, 1982; Moroni, 1999). Ezen kijelentésünket támasztják alá csoportunk analitikai vizsgálatai eredményei, amelyben perifériásan adott KYN hatására vizsgáltuk a KYN és a KYNA koncentrációt a vérplazmában és egyes agyterületeken (Sas és mtsai., 2008). A KYN, KYNA vagy ezek valamely származéka remélhetőleg a humán gyógyászatban is alkalmazható szer lesz, és hatékonyan lehet majd alkalmazni a stroke-nak és egyéb agyi keringési zavar kockázatának kitett betegek esetében megelőző terápiaként, és esetleg a posztischaemiás kezelések részeként is. Ebbéli reményünket erősíti az az információ, hogy egy amerikai munkacsoport (R. Schwarcz) által kifejlesztett KYNA-származék már a klinikai kipróbálás II. fázisában van. Munkacsoportunknak is két nemzetközi szabadalma született a témában elért eredményeink alapján.

Traumás agyi sérülés és stroke során előforduló másik nagy probléma az, hogy nagymennyiségű Glu szabadul fel, ami excitotoxikus hatású, és így kiterjedt agyi területen okoz másodlagos neuronpusztulást. A koordinálatlan Glu felszabadulás okozza azt az extrém magas Glu-szintet, amely patológiás körülmények között a kiterjedt neuronkárosodást és a neuronpusztulást okozza. A Glu káros hatását a sérülés által érintett területet körülvevő ép agyszövet jól működő EAAT-ei fékezhetik meg (Vesce és mtsai., 2007).

Az agyban mintegy 100 millió kapilláris van, ha kis túlzással is, de az agyban majdnem minden neuron rendelkezik saját kapillárisal (Bickel és mtsai., 2001). Ez a tény azért

fontos, mert az agyi kapilláris hálózat nagyon gazdag EAAT-ben, mind az érfalon, mind az azt körülvevő asztrocita végtalpakon is számos EAAT-t találunk (Chaudhry és mtsai., 1995; Lehre és mtsai., 1995). Tehát az agyi erek EAAT-ei lehetnek felelősek az igen nagy jelentőségű agyból a vérbe történő Glu effluxért, amelynek jelentősége jelenleg kevésbé ismert. Ha a vérben lecsökken a Glu-szint, akkor ez szívó hatást fejt ki az agyi ISF-ben megemelkedett Glu-szint számára. Gottlieb és munkatársai (2003) a vér Glu-szintjének lecsökkentéséhez a vérben található enzim a GOT jelenlétét és működését használták ki. Ezen enzim a Glu-ot OxAc, mint koszubsztrát jelenlétben átalakítja 2- $\alpha$ -ketoglutaráttá és aszpartáttá. Ezen enzimreakció révén lecsökken a vér Glu-szintje és kialakulhat a már említett elszívó hatás, a Glu-scavenging. Kísérletes eredmények bizonyítják ezen elgondolás helyes voltát (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007).

Az oxálecetsav kezelés alkalmazásának időablaka igen szűk: patkány esetében nem telhet el két óránál több a trauma és a kezelés között (Gottlieb és mtsai., 2003; Zlotnik és mtsai., 2007). Ez az időintervallum egybevág azzal az időtartammal, amely idő alatt a vérben jelentősen megnő a Glu koncentráció ischaemiás stroke-ot, vagy traumás agyi sérülést követően (Faden és mtsai., 1989; Guyot és mtsai., 2001). A humán terápiás ablak ennél jelentősen tágabb, mivel a stroke-ot, vagy traumás agyi sérülést követően órákkal, sőt napokkal később is még megfigyelhető a megemelkedett Glu-szint (Baker és mtsai., 1993; Bullock és mtsai., 1998; Vespa és mtsai., 1998).

Munkánk másik felében a hipoperfúziós modell (2VO) esetében próbáltunk neuroprotekciós hatást elérni intravénás OxAc alkalmazásával, az agyból a vérbe történő Glu elvonást kihasználva, a fentebb részletezett mechanizmus alapján. Szöveti vizsgálatunk azt az eredményt mutatták, hogy a 30 perces hipoperfúzió nem okoz mérhető szövettani elváltozást a hippocampusban. Hisztológiai kísérleteink után megvizsgáltuk a hipoperfúzió hatására hogyan változik hippocampus funkcionális működése. A kontroll LTP-vel (a kontroll szinthez képest 140%-os fEPSP amplitúdót mérhettünk a teljes regisztrációs periódus alatt) összehasonlítva a hipoperfúziós csoportban kiváltható LTP kisebb mértékű volt (max. 121%-os növekedés), és tartósságát tekintve is elmaradt a kontrollhoz képest (a regisztrációs egy óra végére kontroll szakasz értékeihez közeli értékeket mérünk). Elektrofiziológiai kísérleteinkben az OxAc kezelést a reperfúzió kezdetén kezdtük el, és 30 percen keresztül adagoltuk a hatóanyagot, így a kritikus időablakon belül csökkentettük le a vér Glu-szintjét, amely ezáltal szívóhatást gyakorolhatott az agyban megemelkedett Glu-szintre. Az alkalmazott OxAc kezelés dózis-függő módon kivédte a hipoperfúzió okozta hosszútávú szinaptikus plaszticitás-károsodást.

Sem a hipoperfúzió, sem az OxAc kezelés nem befolyásolta az alapvető glutamáterg szinaptikus funkciókat, ahogyan ez látszik az IO görbék és a páros impulzus paradigma kísérletek eredményeiből.

Remélhetőleg a jövőben az OxAc alkalmazása szintén egy új terápiás lehetőség alapjául szolgál majd a humán gyógyászatban a hypoxiás és/vagy az ischaemiás események utáni neuroprotekciós kezelés részeként. A glutamát scavengerek alkalmazása számos előnnyel rendelkezik a klasszikus neuroprotektív szerekkel szemben: 1) az OxAc kezelés nem receptor moduláción keresztül fejt ki hatását, hanem egy a vérben megtalálható enzim – a GOT – által katalizált biokémiai reakció (7. ábra) eltolása révén. Így nem akadályozzák azon fiziológiás eseményeket, amelyek az agysérülés utáni neurorepair folyamatában végbemennének, és amelyekben a Glu-nak, mint neurotransmitternek, valamint receptorainak jelentős szerepe van (Biegon és mtsai., 2004). 2) A Glu scavengerek hatására az agyból a vérbe történő Glu efflux magától visszatér az eredeti (normál) értékre, ha az agy és a vér közötti Glu koncentráció különbség kiegyenlítődik, és megszűnik a kapillárisok falában lévő EAAT aktiváció is. 3) Az OxAc endogén vegyület szemben számos eddig kipróbált neuroprotektívnek vélt hatóanyaggal szemben (pl.: MK-801). 4) A kísérleti eredményeinkből és az elméleti megfontolásokból is következik, hogy elég a kezelést egyszer alkalmazni, azaz rövid idővel az ischaemiás infarktust követően egyszer kell a véráramba juttatni a Glu scavengereket.

Munkánkban elsőként adtunk elektrofiziológiai bizonyítékot a Glu scavenger OxAc kezelés hatásosságáról, amely a későbbiek során ígéretes neuroprotekciós lehetőség lehet. Jövőbeli terveink között szerepel a Glu scavengerek alkalmazásának kipróbálása globális és fokális agyi ischaemia esetén is, valamint együtt alkalmazva más neuroprotektív támadáspontú szerekkel.

Szeretnénk továbbá olyan KYNA származékokat szintetizálni és tesztelni, amelyek könnyen átjutnak a vér-agy gáton és poszt-ischaemiás alkalmazás során, és neuroprotektív hatással bírnak.

## Összefoglaló:

A központi idegrendszer sérülései, oxigénhiányos állapot (hipoperfúzió, stroke) és különböző traumás behatások eredményeképpen a fiziológiásnál jóval több glutamát szabadul fel a neuronokból az agy intersticiális terébe. Fiziológiás körülmények kötött a glutamát serkentő neurotransmitterként vesz részt az idegrendszeri szinaptikus áttevődésben. Túlzott mennyiségű glutamát jelenlétében a sejtekbe történő  $\text{Ca}^{2+}$ -ion beáramlás megnő, ami megemeli a sejtek intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  koncentrációját. A megemelkedett intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -szint különböző enzimatis kaszkád folyamatokat indukál. Patológiás  $\text{Ca}^{2+}$  koncentráció apoptotikus folyamatokat indít be, ami végezetül sejtpusztuláshoz vezet.

Az agy ischaemiára egyik legérzékenyebb területe a hippocampus CA1-es régiója, ezen belül pedig az itt található piramis-sejtek. A hippocampus CA1-es területe alkalmas arra, hogy itt a különböző mértékű agyi vérellátás-csökkenés esetén detektálni lehessen a kialakuló szövettani és funkcionális elváltozásokat.

Széles körben elfogadott, hogy az agyat érintő ischaemia során a  $\text{Ca}^{2+}$  sejtbe történő bejutásában fontos szerepe van a serkentő aminosav receptoroknak, így az NMDA receptoroknak is.

A serkentő neurotransmitter glutamát, és az NMDA receptor fontos szerepet tölt be az idegi plaszticitás kialakításában (pl.: így az LTP létrejöttében). Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a szinaptikus plaszticitás kialakíthatóságát (LTP indukálhatóságot) az ischaemiás esemény jelentősen lerontja.

A fentiekből adódik, hogy az NMDA-receptorok részleges blokkolásával elérhetjük azt, hogy kevesebb idegsejt fog elpusztulni abban az esetben is, ha a fiziológiásnál magasabb az agyi glutamát szint. Azaz, az NMDA receptorok blokkolása neuroprotektív eredményezhet.

Kísérleteink első felében azt a feltételezésünket próbáltuk igazolni, miszerint rövid ideig tartó (10 perc) globális agyi ischaemia esetén a perifériásan alkalmazott kinurenin (KYN) és probenecid (PROB) neuroprotektív hatást fejt ki a központi idegrendszerben. A kinurénsav (KYNA) az egyike a kevés eddig ismert endogén NMDA receptor antagonistának. Korábbi kísérletes adataink és az irodalom is beszámol a KYNA neuroprotektív hatásáról számos neurodegeneratív kórképben. A KYNA alkalmazását azonban korlátozza az a tulajdonsága, hogy csak nagyon csekély mértékben képes átjutnia

a vér-agy gáton. Ezért alkalmaztuk kísérleteinkben a KYNA előanyagát, a KYN-t, amely könnyen bejut az agyba, és ott KYNA-vá alakul. A KYNA nem bomlik tovább, hanem a vizelettel távozik a szervezetből. Az agyszövetből történő kiürülése a PROB érzékeny szerves-sav transzporterekén keresztül történik. A PROB tehát képes megnövelni az agyszövetben a KYNA szintjét.

Szövetteni vizsgálataink eredményei és az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a globális ischaemia hatására az agy hypoxiára legérzékenyebb területén, a hippocampus CA1-es régiójában drasztikus mértékű neuronpusztulás tapasztalható. Eredményeink szerint, egy ilyen átmeneti globális ischaemia után négy napon keresztül perifériásan alkalmazott KYN+PROB kezelés ugyan kis mértékben csökkentette a neuronpusztulás mértékét, de ez a javulás nem érte el a statisztikailag szignifikáns szintet. Ha azonban az ischaemiás periódus előtt elkezdődött a kezelés (KYN+PROB előkezelés), és az ischaemiás beavatkozás után további négy napig folytatódott, akkor ez képes volt szignifikáns mértékben lecsökkenteni a hippocampusban a globális agyi ischaemia hatására kialakult neuronkárosodás mértékét. Elektrofiziológiai kísérleteinkben már csak a hisztológiai vizsgálatok során hatásosnak bizonyult csoportot vittük tovább. Tíz nappal a 10 perces teljes agyi ischaemia után megvizsgálva a hippocampus funkcionális állapotát, azt tapasztaltuk, hogy az irodalmi adatoknak megfelelően a hosszan tartó szinaptikus plaszticitás – LTP – kialakulása és fenntartása is zavart szenved. Az előkezelt csoportban (KYN+PROB kezelést az ischaemiát megelőző napon és utána 4 napig alkalmaztuk) az LTP kiválthatósága nem különbözött a kontroll csoport eredményétől. Kijelenthető tehát, hogy a KYN+PROB előkezelés lecsökkentette a 4VO által kiváltott ischaemia okozta neuronsérülés mértékét a hippocampus CA1-es régiójában, és megakadályozta a hosszú távú szinaptikus plaszticitás indukálhatóságának romlását.

Munkánk másik felében egy hipoperfúziós modellen próbáltunk neuroprotekciós hatást elérni intravénás oxálecetsav (OxAc) alkalmazásával, az agyból a vérbe történő glutamát (Glu) transzport fokozásával. A módszer lényege a cerebrospinális folyadék glutamát tartalmának lecsökkentése. A megemelkedett Glu-szintet normál esetben a  $\text{Na}^+$ -függő Glu-transzporterek csökkentik le. Ezek a transzporterek megtalálhatók az idegsejtek axonterminálisain és az asztrocitákon. Ezenkívül találunk még Glu-transzportereket az agyi endotél falában is, amelyek a még kevésbé ismert agyból a vérbe történő Glu transzportért felelősek. Az agyból a vérbe történő Glu transzport alapvetően gyors folyamat, ami a vérben található enzimek (a glutamát-oxálecetsav transzamináz és a glutamát-piruvát transzamináz) segítségével tovább gyorsítható. A vérben ezen enzimek Glu és

koszubsztrátjaik (a piruvát és az oxálecetsav) jelenlétében a Glu-ot  $\alpha$ -ketoglutaráttá alakítják át, ezzel csökkentve a vér Glu-tartalmát, és ezzel egy szívóhatást alakítanak ki a megemelkedett agyi Glu-szint számára. Ha a vérben megnöveljük az oxálecetsav (OxAc) vagy a piruvát (Pyr) szintjét, akkor tehát az enzimreakció eltolható a Glu átalakítás irányába tovább fokozva így az agyból a vérbe történő Glu-transzport mértékét.

Kísérleteinkben *in vitro* elektrofiziológiai mérések és szövettani módszerek alkalmazásával vizsgáltuk a kétoldali arteria carotis communis elszorításával kialakított globális agyi hipoperfúzió hatását patkány hippocampusban. Szövettani eredményeink azt mutatták, hogy a 30 perces hipoperfúzió nem okoz detektálható szövettani elváltozást a hippocampus legérzékenyebb CA1-es régiójában sem. Azonban a hosszú távú szinaptikus plaszticitás vizsgálata során már jelentkezik káros hatása. Elektrofiziológiai kísérleteinkben az OxAc kezelést a reperfúzió kezdetén kezdtük el, és 30 percen keresztül adagoltuk a hatóanyagot, így a kritikus időablakon belül csökkentettük le a vér Glu-szintjét, amely – a fentiekben részletezettek szerint –, szívó hatást gyakorolhatott az agyban megemelkedett Glu-szintre. Eredményeink az mutatják, hogy OxAc kezelés dózisfüggő módon kivédte a hipoperfúzió okozta LTP kialakíthatóságban jelentkező károsodást. Azonban sem a hipoperfúzió, sem az OxAc kezelés nem befolyásolta az alapvető glutamáterg szinaptikus funkciókat, ahogyan ez elektrofiziológiai vizsgálataink alapján megállapítható volt. A biztató eredmények rávilágítottak a glutamát scavengerek neuroprotektív hatására. Fontos hangsúlyozni, hogy az oxálecetsav egy endogén anyag, valamint hogy neuroprotektív hatását nem közvetlen receptormoduláció révén éri el.

Biztató kísérleti eredményeink alapján reméljük, hogy a KYN, KYNA vagy ezek valamely származéka a nem túl távoli jövőben a humán gyógyászatban is alkalmazható szer lesz. Talán eredményesen lehet majd alkalmazni pl. stroke-nak, agyi keringési zavar kockázatának kitett betegek és egyéb neurológiai kórképek esetén is, mint megelőző terápia, de elméletileg posztischeamiás kezelések részeként is szóba jöhetnek.

Hasonló reményeink vannak a glutamát scavengerek, mint eddig még nem ismert neuroprotektív stratégia alkalmazását illetően is.



## Summary:

Transient global ischemia, which may arise during cardiac arrest and surgery in humans or be induced experimentally in animals, elicits selective, delayed neuronal death. If the duration of the ischemia is short, neuronal damage occurs only in vulnerable areas. The pyramidal neurons in the hippocampal CA1 region are particularly vulnerable. Additionally, global ischemia impairs memory and learning functions. Other neurons, such as the hippocampal CA3 neurons, are less ischemia-vulnerable (Kirino, 1982; Pulsinelli, 1985). It is widely accepted that activation of the excitatory amino acid receptors plays an important role in neuronal death in stroke (Choi, 1988). It has recently been reported that glutamate (Glu)-induced excitotoxicity and a cellular calcium overload are among the key factors of cell death in brain ischemia, especially in the gray matter (Dohmen et al., 2005). By definition, excitotoxicity is a result of overexcitation of the Glu receptors. In turn, neuroprotective strategies have utilized antagonists of the Glu receptors to prevent excitotoxic neuronal loss. Long-term potentiation (LTP), also mediated by Glu receptors, is a model of neuronal plasticity. Accordingly, ischemia may likewise impair physiological forms of synaptic plasticity, such as activity-dependent LTP.

Kynurenic acid (KYNA) is one of the few known endogenous N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor inhibitors. Experimental data and theoretical considerations suggest that KYNA or its metabolic precursor, L-kynurenine (KYN), may be of therapeutic value in neurodegenerative disorders.

The aim of the present study was to reveal whether KYN can rescue the CA1 neurons in the four-vessel occlusion (4VO) model in the rat, which is a species more widely used than the gerbil in the course of ischemic studies. KYN was administered together with probenecid (PROB), an organic acid transporter inhibitor, in order to facilitate the brain penetration of KYN.

KYN administration has proved to be neuroprotective in histological studies. KYN treatment appreciably decreased the number of injured pyramidal cells in the CA1 region of the hippocampus in the four-vessel occlusion (4VO)-induced ischemic rat brain. A protective effect of KYN on the functioning of the CA1 region was observed: long-term potentiation was abolished in the 4VO animals, but its level and duration were restored by pretreatment with KYN. A novel finding here is that the administration of KYN (+PROB) once before and 4 times after 4VO-induced transient global ischemia proved

neuroprotective in histological studies, and also reduced (nearly abolished) the impaired LTP induction in the Schaffer collateral-CA1 pathway in adult rats. It is concluded that the administration of KYN elevates the KYNA concentration in the brain to neuroprotective levels. These results raise the possibility that long-term KYN administration may be useful in delaying neuronal loss in certain neurodegenerative disorders

On the other hand, neurodegenerative conditions such as stroke and traumatic brain injury are characterized by the presence of extremely high Glu levels in the brain fluids. The excess Glu, which causes neuronal death via excitotoxicity, is normally controlled by members of a family of  $\text{Na}^+$ -dependent Glu transporters located on nerve terminals and astrocytes. By pumping Glu, they guarantee the presence of Glu in brain fluids at levels at which it exerts neither excitotoxic nor unsolicited excitatory effects (Sattler and Tymianski, 2001). Glu transporters located on the brain vasculature may also play an important role in controlling extracellular Glu levels via a brain-to-blood Glu efflux. At any event, the brain-to-blood Glu efflux mediated by excitatory amino acid transporters is fast and greatly enhanced by the blood Glu scavengers oxaloacetate and pyruvate which, upon intravenous administration activate the blood-resident glutamate-oxaloacetate transaminase and glutamate-pyruvate transaminase, respectively, causing Glu deamination into  $\alpha$ -ketoglutarate. The scavenging of blood Glu increases the driving force for a brain-to-blood Glu efflux and leads to a decrease in the excess Glu present in the brain extracellular fluids. The scavenging of blood Glu increases the driving force for the brain-to-blood Glu efflux and causes a decrease in the excess Glu present in the brain extracellular fluids.

In the second series of experiments we tested the hypothesis that the intravenous administration of a blood glutamate scavenger, oxaloacetate, administered immediately after a 30-min period of ischemia, helps the brain retain its synaptic plasticity. In the present study, oxaloacetate was administered in the first 30 min of the reperfusion period and was found to prevent the LTP impairment caused by ischemia without affecting the basal glutamatergic synaptic functions, as concluded from the results of the paired-pulse facilitation and the input-output curves. In the future, the administration of oxaloacetate to humans might open up new therapeutic possibilities basically different from those involving the administration of Glu receptor antagonists: 1) In contrast with the use of Glu receptor antagonists, the activity of Glu scavengers in stimulating the brain-to blood Glu efflux is self-limiting, since this activity progressively diminishes as the elevated brain Glu level decreases to concentrations below the threshold of activation of the Glu

transporters on the brain vasculature (i.e below their  $K_m$  values). 2) Blood Glu scavengers do not affect ionotropic Glu receptors, whereas Glu receptor antagonists obviously do, and hence they will not block the beneficial effects of Glu in the neurorepair proceeding after brain injury.

These results suggest L-kynurenine and oxaloacetate will be of potential clinical use for the prevention of neuronal loss in ischemic conditions.

## **Köszönetnyilvánítás:**

Ezúton szeretném megköszönni kutatócsoportunk vezetőjének Dr. Toldi József professzor úrnak, hogy a Szegedi Tudományegyetem Élettani, Szervezettani és Idegtudományi Tanszékén biztosította számomra a Ph.D. disszertációm elkészítésének feltételeit.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek Dr. Farkas Tamásnak, hogy már hallgató korom óta segítette munkámat, valamint hogy a három éves doktorandusz időszakom alatt az eredményes közös munkán túl is mindenben számíthattam a segítségére.

Szeretném megköszönni Rákos Gabriellának, Robotka Herminának, Dr. Kis Zsoltnak, Fuzik Jánosnak és barátomnak Nagy Dávidnak, hogy elméleti és gyakorlati munkájukkal, tanácsaikkal, észrevételeikkel segítették dolgozatom elkészülését, és emberileg támogattak munkám során. Külön köszönet Berkó Anikónak a számítástechnikai és Veketyné Váradi Margónak az adminisztratív segítségért.

Továbbá köszönet Dr. Vécsei László professzor úrnak, Dr. Sas Katalinnak a kinureninekkal végzett kísérletek során nyújtott segítségéért; Dr. Giegler Gábornak és Dr. Ágoston Mártának a 4VO modell megtanításáért. Sok köszönet illeti Prof. Vivian I. Teichberget, azért, mert a glutamát transzporterekkel elért eredményeiket felhasználhattuk ischaemiás modelljeink esetében, és amiért munkánk során mindig segítségünkre állt szaktudásával.

Végül, de nem utolsó sorban köszönöm szüleimnek és kedvesemnek, Cser Adriennek, hogy nyugodt, biztonságos háttérrel biztosítottak számomra, és hogy mindig mellém álltak a nehéz pillanatokban.

## Irodalomjegyzék:

- Adams H. P., Jr., Brott T. G., Crowell R. M., Furlan A. J., Gomez C. R., Grotta J., Helgason C. M., Marler J. R., Woolson R. F. and Zivin J. A. (1994). "Guidelines for the management of patients with acute ischemic stroke. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association." Circulation **90**(3): 1588-601.
- Ahmed N., Nasman P. and Wahlgren N. G. (2000). "Effect of intravenous nimodipine on blood pressure and outcome after acute stroke." Stroke **31**(6): 1250-5.
- Akers R. F., Lovinger D. M., Colley P. A., Linden D. J. and Routtenberg A. (1986). "Translocation of protein kinase C activity may mediate hippocampal long-term potentiation." Science **231**(4738): 587-9.
- al-Sarraf H. and Philip L. (2003). "Increased brain uptake and CSF clearance of 14C-glutamate in spontaneously hypertensive rats." Brain Res **994**(2): 181-7.
- al-Sarraf H., Preston J. E. and Segal M. B. (1995). "The entry of acidic amino acids into brain and CSF during development, using in situ perfusion in the rat." Brain Res Dev Brain Res **90**(1-2): 151-8.
- al-Sarraf H., Preston J. E. and Segal M. B. (1997a). "Acidic amino acid accumulation by rat choroid plexus during development." Brain Res Dev Brain Res **102**(1): 47-52.
- al-Sarraf H., Preston J. E. and Segal M. B. (1997b). "Changes in the kinetics of the acidic amino acid brain and CSF uptake during development in the rat." Brain Res Dev Brain Res **102**(1): 127-34.
- Andersen P., Sundberg S. H., Sveen O. and Wigstrom H. (1977). "Specific long-lasting potentiation of synaptic transmission in hippocampal slices." Nature **266**(5604): 736-7.
- Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R. and Martinou J. C. (2000). "Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria." Biochem J **345 Pt 2**: 271-8.
- Asakura K., Matsuo Y., Oshima T., Kihara T., Minagawa K., Araki Y., Kagawa K., Kanemasa T. and Ninomiya M. (2000). "omega-agatoxin IVA-sensitive Ca(2+) channel blocker, alpha-eudesmol, protects against brain injury after focal ischemia in rats." Eur J Pharmacol **394**(1): 57-65.
- Asano T., Mori T., Shimoda T., Shinagawa R., Satoh S., Yada N., Katsumata S., Matsuda S., Kagamiishi Y. and Tateishi N. (2005). "Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B." Curr Drug Targets CNS Neurol Disord **4**(2): 127-42.
- Aurell A., Rosengren L. E., Karlsson B., Olsson J. E., Zbornikova V. and Haglid K. G. (1991). "Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction." Stroke **22**(10): 1254-8.
- Back T., Kohno K. and Hossmann K. A. (1994). "Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram." J Cereb Blood Flow Metab **14**(1): 12-9.
- Bading H. and Greenberg M. E. (1991). "Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation." Science **253**(5022): 912-4.
- Bagetta G., Chiappetta O., Amantea D., Iannone M., Rotiroti D., Costa A., Nappi G. and Corasaniti M. T. (2004). "Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat." Neurosci Lett **368**(1): 87-91.

- Baker A. J., Moulton R. J., MacMillan V. H. and Shedden P. M. (1993). "Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans." J Neurosurg **79**(3): 369-72.
- Barbour B., Szatkowski M., Ingledew N. and Attwell D. (1989). "Arachidonic acid induces a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells." Nature **342**(6252): 918-20.
- Battaglia G., La Russa M., Bruno V., Arenare L., Ippolito R., Copani A., Bonina F. and Nicoletti F. (2000). "Systemically administered D-glucose conjugates of 7-chlorokynurenic acid are centrally available and exert anticonvulsant activity in rodents." Brain Res **860**(1-2): 149-56.
- Beal M. F., Matson W. R., Storey E., Milbury P., Ryan E. A., Ogawa T. and Bird E. D. (1992). "Kynurenic acid concentrations are reduced in Huntington's disease cerebral cortex." J Neurol Sci **108**(1): 80-7.
- Beart P. M. and O'Shea R. D. (2007). "Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement." Br J Pharmacol **150**(1): 5-17.
- Beck T., Goller H. J. and Wree A. (1995). "Chronic depression of glucose metabolism in postischemic rat brains." Stroke **26**(6): 1107-13.
- Bender D. A. and McCreanor G. M. (1982). "The preferred route of kynurenine metabolism in the rat." Biochim Biophys Acta **717**(1): 56-60.
- Bertolino M., Vicini S. and Costa E. (1989). "Kynurenic acid inhibits the activation of kainic and N-methyl-D-aspartic acid-sensitive ionotropic receptors by a different mechanism." Neuropharmacology **28**(5): 453-7.
- Bickel U., Yoshikawa T. and Pardridge W. M. (2001). "Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier." Adv Drug Deliv Rev **46**(1-3): 247-79.
- Biegon A., Fry P. A., Paden C. M., Alexandrovich A., Tsenter J. and Shohami E. (2004). "Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(14): 5117-22.
- Birch P. J., Grossman C. J. and Hayes A. G. (1988). "Kynurenic acid antagonises responses to NMDA via an action at the strychnine-insensitive glycine receptor." Eur J Pharmacol **154**(1): 85-7.
- Bliss T. V. and Collingridge G. L. (1993). "A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus." Nature **361**(6407): 31-9.
- Bliss T. V. and Lomo T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." J Physiol **232**(2): 331-56.
- Bottiger B. W., Grabner C., Bauer H., Bode C., Weber T., Motsch J. and Martin E. (1999). "Long term outcome after out-of-hospital cardiac arrest with physician staffed emergency medical services: the Utstein style applied to a midsize urban/suburban area." Heart **82**(6): 674-9.
- Bridgers S., Koch G., Munera C., Karwon M. and Kurtz N. M. (1991). "Intravenous nimodipine in acute stroke: Interim analysis of randomized trial." Stroke **22**: 29.
- Bullock R., Zauner A., Woodward J. J., Myseros J., Choi S. C., Ward J. D., Marmarou A. and Young H. F. (1998). "Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury." J Neurosurg **89**(4): 507-18.
- Burda J., Matiasova M., Gottlieb M., Danielisova V., Nemethova M., Garcia L., Salinas M. and Burda R. (2005). "Evidence for a role of second pathophysiological stress in prevention of delayed neuronal death in the hippocampal CA1 region." Neurochem Res **30**(11): 1397-405.

- Calabresi P., Centonze D., Pisani A., Cupini L. and Bernardi G. (2003). "Synaptic plasticity in the ischaemic brain." Lancet Neurol **2**(10): 622-9.
- Cavus E., Bein B., Dorges V., Stadlbauer K. H., Wenzel V., Steinfath M., Hanss R. and Scholz J. (2006). "Brain tissue oxygen pressure and cerebral metabolism in an animal model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation." Resuscitation **71**(1): 97-106.
- Celsis P., Agniel A., Puel M., Rascol A. and Marc-Vergnes J. P. (1987). "Focal cerebral hypoperfusion and selective cognitive deficit in dementia of the Alzheimer type." J Neurol Neurosurg Psychiatry **50**(12): 1602-12.
- Chan S. A., Reid K. H., Schurr A., Miller J. J., Iyer V. and Tseng M. T. (1998). "Fosphenytoin reduces hippocampal neuronal damage in rat following transient global ischemia." Acta Neurochir (Wien) **140**(2): 175-80.
- Chaudhry F. A., Lehre K. P., van Lookeren Campagne M., Ottersen O. P., Danbolt N. C. and Storm-Mathisen J. (1995). "Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry." Neuron **15**(3): 711-20.
- Choi D. W. (1988). "Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system." Neuron **1**(8): 623-34.
- Christensen H. N. (1984). "Organic ion transport during seven decades. The amino acids." Biochim Biophys Acta **779**(3): 255-69.
- Clark W. M., Raps E. C., Tong D. C. and Kelly R. E. (2000). "Cervene (Nalmefene) in acute ischemic stroke: final results of a phase III efficacy study. The Cervene Stroke Study Investigators." Stroke **31**(6): 1234-9.
- Coyle J. T. and Puttfarcken P. (1993). "Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders." Science **262**(5134): 689-95.
- Cozzi A., Carpenedo R. and Moroni F. (1999). "Kynurenine hydroxylase inhibitors reduce ischemic brain damage: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[N-4-(nitrophenyl)thiazol-2yl]-benzenesulfonamide (Ro 61-8048) in models of focal or global brain ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **19**(7): 771-7.
- Creager R., Dunwiddie T. and Lynch G. (1980). "Paired-pulse and frequency facilitation in the CA1 region of the in vitro rat hippocampus." J Physiol **299**: 409-24.
- Cross A. J., Jones J. A., Baldwin H. A. and Green A. R. (1991). "Neuroprotective activity of chlormethiazole following transient forebrain ischaemia in the gerbil." Br J Pharmacol **104**(2): 406-11.
- Cross A. J., Jones J. A., Snares M., Jostell K. G., Bredberg U. and Green A. R. (1995). "The protective action of chlormethiazole against ischaemia-induced neurodegeneration in gerbils when infused at doses having little sedative or anticonvulsant activity." Br J Pharmacol **114**(8): 1625-30.
- Danbolt N. C. (2001). "Glutamate uptake." Prog Neurobiol **65**(1): 1-105.
- Davis S. M., Lees K. R., Albers G. W., Diener H. C., Markabi S., Karlsson G. and Norris J. (2000). "Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist." Stroke **31**(2): 347-54.
- Dawson D. A. (1994). "Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome." Cerebrovasc Brain Metab Rev **6**(4): 299-324.
- De Jong G. I., Farkas E., Stienstra C. M., Plass J. R., Keijser J. N., de la Torre J. C. and Luiten P. G. (1999). "Cerebral hypoperfusion yields capillary damage in the hippocampal CA1 area that correlates with spatial memory impairment." Neuroscience **91**(1): 203-10.
- de la Torre J. C. (1999). "Critical threshold cerebral hypoperfusion causes Alzheimer's disease?" Acta Neuropathol **98**(1): 1-8.

- de la Torre J. C., Fortin T., Park G. A., Butler K. S., Kozlowski P., Pappas B. A., de Socarraz H., Saunders J. K. and Richard M. T. (1992). "Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats." Brain Res **582**(2): 186-95.
- Derdeyn C. P., Videen T. O., Fritsch S. M., Carpenter D. A., Grubb R. L., Jr. and Powers W. J. (1999). "Compensatory mechanisms for chronic cerebral hypoperfusion in patients with carotid occlusion." Stroke **30**(5): 1019-24.
- Dirnagl U., Simon R. P. and Hallenbeck J. M. (2003). "Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection." Trends Neurosci **26**(5): 248-54.
- Dohmen C., Kumura E., Rosner G., Heiss W. D. and Graf R. (2005). "Extracellular correlates of glutamate toxicity in short-term cerebral ischemia and reperfusion: a direct in vivo comparison between white and gray matter." Brain Res **1037**(1-2): 43-51.
- Eckstein M., Stratton S. J. and Chan L. S. (2005). "Cardiac Arrest Resuscitation Evaluation in Los Angeles: CARE-LA." Ann Emerg Med **45**(5): 504-9.
- Ellinger A. (1904). "Die Entstehung der kyolure sare." Z. Physiol Chem **43**: 325-7.
- Erhardt S., Blennow K., Nordin C., Skogh E., Lindstrom L. H. and Engberg G. (2001). "Kynurenic acid levels are elevated in the cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia." Neurosci Lett **313**(1-2): 96-8.
- Faden A. I., Demediuk P., Panter S. S. and Vink R. (1989). "The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury." Science **244**(4906): 798-800.
- Farkas B., Tantos A., Schlett K., Vilagi I. and Friedrich P. (2004). "Ischemia-induced increase in long-term potentiation is warded off by specific calpain inhibitor PD150606." Brain Res **1024**(1-2): 150-8.
- Farkas E., de Wilde M. C., Kiliaan A. J. and Luiten P. G. (2002). "Chronic cerebral hypoperfusion-related neuropathologic changes and compromised cognitive status: window of treatment." Drugs Today (Barc) **38**(5): 365-76.
- Farkas E. and Luiten P. G. (2001). "Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease." Prog Neurobiol **64**(6): 575-611.
- Fischer M., Kaech S., Knutti D. and Matus A. (1998). "Rapid actin-based plasticity in dendritic spines." Neuron **20**(5): 847-54.
- Fogelholm R., Erila T., Palomaki H., Murros K. and Kaste M. (2000). "Effect of nimodipine on final infarct volume after acute ischemic stroke." Cerebrovasc Dis **10**(3): 189-93.
- Foster A. C., Vezzani A., French E. D. and Schwarcz R. (1984). "Kynurenic acid blocks neurotoxicity and seizures induced in rats by the related brain metabolite quinolinic acid." Neurosci Lett **48**(3): 273-8.
- Fukui S., Schwarcz R., Rapoport S. I., Takada Y. and Smith Q. R. (1991). "Blood-brain barrier transport of kynurenines: implications for brain synthesis and metabolism." J Neurochem **56**(6): 2007-17.
- Gasparova Z., Jariabka P. and Stolc S. (2008). "Effect of transient ischemia on long-term potentiation of synaptic transmission in rat hippocampal slices." Neuro Endocrinol Lett **29**(5): 702-5.
- Geinisman Y., deToledo-Morrell L. and Morrell F. (1991). "Induction of long-term potentiation is associated with an increase in the number of axospinous synapses with segmented postsynaptic densities." Brain Res **566**(1-2): 77-88.
- Gigler G., Szenasi G., Simo A., Levay G., Harsing L. G., Jr., Sas K., Vecsei L. and Toldi J. (2007). "Neuroprotective effect of L-kynurenine sulfate administered before focal cerebral ischemia in mice and global cerebral ischemia in gerbils." Eur J Pharmacol **564**(1-3): 116-22.



- Gillardon F., Kiprianova I., Sandkuhler J., Hossmann K. A. and Spranger M. (1999). "Inhibition of caspases prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia." Neuroscience **93**(4): 1219-22.
- Giroux C., Rosen P., and Scatton B. (1994). Preclinical pharmacology and clinical safety profile of eliprodil, an atypical NMDA receptor antagonist. in Kriegelstein J, Oberpichler-Schwenk H (eds): Pharmacology of Cerebral Ischemia. Stuttgart, Medpharm Scientific, 643-648
- Gorgulu A., Kins T., Cobanoglu S., Unal F., Izgi N. I., Yanik B. and Kucuk M. (2000). "Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat." Acta Neurochir (Wien) **142**(11): 1287-92.
- Gottlieb M., Wang Y. and Teichberg V. I. (2003). "Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate." J Neurochem **87**(1): 119-26.
- Graham S. H., Chen J., Lan J., Leach M. J. and Simon R. P. (1994). "Neuroprotective effects of a use-dependent blocker of voltage-dependent sodium channels, BW619C89, in rat middle cerebral artery occlusion." J Pharmacol Exp Ther **269**(2): 854-9.
- Grotta J. (1997). "Lubeluzole treatment of acute ischemic stroke. The US and Canadian Lubeluzole Ischemic Stroke Study Group." Stroke **28**(12): 2338-46.
- Guillemin G. J., Williams K. R., Smith D. G., Smythe G. A., Croitoru-Lamoury J. and Brew B. J. (2003). "Quinolinic acid in the pathogenesis of Alzheimer's disease." Adv Exp Med Biol **527**: 167-76.
- Gunn A. J. and Thoresen M. (2006). "Hypothermic neuroprotection." NeuroRx **3**(2): 154-69.
- Guyot L. L., Diaz F. G., O'Regan M. H., McLeod S., Park H. and Phillis J. W. (2001). "Real-time measurement of glutamate release from the ischemic penumbra of the rat cerebral cortex using a focal middle cerebral artery occlusion model." Neurosci Lett **299**(1-2): 37-40.
- Haley E. C., Jr. (1998). "High-dose tirilazad for acute stroke (RANTTAS II). RANTTAS II Investigators." Stroke **29**(6): 1256-7.
- Harris K. M., Fiala J. C. and Ostroff L. (2003). "Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **358**(1432): 745-8.
- Hartai Z., Juhasz A., Rimanoczy A., Janaky T., Donko T., Dux L., Penke B., Toth G. K., Janka Z. and Kalman J. (2007). "Decreased serum and red blood cell kynurenic acid levels in Alzheimer's disease." Neurochem Int **50**(2): 308-13.
- Hilmas C., Pereira E. F., Alkondon M., Rassoulpour A., Schwarcz R. and Albuquerque E. X. (2001). "The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications." J Neurosci **21**(19): 7463-73.
- Homer H. (1914). "The constitution of kynurenic acid." J Biol Chem **17**: 509-518.
- Hong S. J. and Chiou G. C. (1998). "Effects of Intracellular Calcium Reduction by Dantrolene on Prevention/Treatment of Ischemic Stroke." J Cardiovasc Pharmacol Ther **3**(4): 299-304.
- Horn J. and Limburg M. (2000). "Calcium antagonists for acute ischemic stroke." Cochrane Database Syst Rev (2): CD001928.
- Horn J., Limburg M. and Vermeulen M. (1999). "VENUS very early nimodipine use in stroke: Final results from a randomised, placebo-controlled trial." Cerebrovasc Dis **9** (Suppl1): 127.

- Hou S. T. and MacManus J. P. (2002). "Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death." *Int Rev Cytol* **221**: 93-148.
- Ishiuchi S., Yoshida Y., Sugawara K., Aihara M., Ohtani T., Watanabe T., Saito N., Tsuzuki K., Okado H., Miwa A., Nakazato Y. and Ozawa S. (2007). "Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation." *J Neurosci* **27**(30): 7987-8001.
- Jauch D., Urbanska E. M., Guidetti P., Bird E. D., Vonsattel J. P., Whetsell W. O., Jr. and Schwarcz R. (1995). "Dysfunction of brain kynurenic acid metabolism in Huntington's disease: focus on kynurenine aminotransferases." *J Neurol Sci* **130**(1): 39-47.
- Jones T. H., Morawetz R. B., Crowell R. M., Marcoux F. W., FitzGibbon S. J., DeGirolami U. and Ojemann R. G. (1981). "Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys." *J Neurosurg* **54**(6): 773-82.
- Juhasz-Vedres G., Rozsa E., Rakos G., Dobszay M. B., Kis Z., Wolfling J., Toldi J., Parducz A. and Farkas T. (2006). "Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective when administered either before or after injury in a focal cortical cold lesion model." *Endocrinology* **147**(2): 683-6.
- Kaminski R. M., Zielinska E., Dekundy A., van Luijckelaar G. and Turski W. (2003). "Deficit of endogenous kynurenic acid in the frontal cortex of rats with a genetic form of absence epilepsy." *Pol J Pharmacol* **55**(5): 741-6.
- Kandel E. R. (2001). "The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses." *Science* **294**(5544): 1030-8.
- Kandel E. R. and Schwartz J. H. (1982). "Molecular biology of learning: modulation of transmitter release." *Science* **218**(4571): 433-43.
- Karhunen H., Jolkkonen J., Sivenius J. and Pitkanen A. (2005). "Epileptogenesis after experimental focal cerebral ischemia." *Neurochem Res* **30**(12): 1529-42.
- Kasai H., Matsuzaki M., Noguchi J., Yasumatsu N. and Nakahara H. (2003). "Structure-stability-function relationships of dendritic spines." *Trends Neurosci* **26**(7): 360-8.
- Kauer J. A., Malenka R. C. and Nicoll R. A. (1988). "A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus." *Neuron* **1**(10): 911-7.
- Kaundal R. K., Iyer S., Kumar A. and Sharma S. S. (2009). "Protective effects of pioglitazone against global cerebral ischemic-reperfusion injury in gerbils." *J Pharmacol Sci* **109**(3): 361-7.
- Kessler M., Terramani T., Lynch G. and Baudry M. (1989). "A glycine site associated with N-methyl-D-aspartic acid receptors: characterization and identification of a new class of antagonists." *J Neurochem* **52**(4): 1319-28.
- Kidwell C. S. and Warach S. (2003). "Acute ischemic cerebrovascular syndrome: diagnostic criteria." *Stroke* **34**(12): 2995-8.
- Kirino T. (1982). "Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia." *Brain Res* **239**(1): 57-69.
- Krause G. S., Kumar K., White B. C., Aust S. D. and Wiegstein J. G. (1986). "Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanisms of tissue injury and prospects for protection." *Am Heart J* **111**(4): 768-80.
- Kruman I., Bruce-Keller A. J., Bredesen D., Waeg G. and Mattson M. P. (1997). "Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis." *J Neurosci* **17**(13): 5089-100.
- Kudo T., Tada K., Takeda M. and Nishimura T. (1990). "Learning impairment and microtubule-associated protein 2 decrease in gerbils under chronic cerebral hypoperfusion." *Stroke* **21**(8): 1205-9.

- Lang T. R., Hartman T. K., Hintz S. R. and Colby C. E. (2007). "Hypothermia for the treatment of neonatal ischemic encephalopathy: is the genie out of the bottle?" Am J Perinatol **24**(1): 27-31.
- Lapchak P. A., Chapman D. F., Nunez S. Y. and Zivin J. A. (2000). "Dehydroepiandrosterone sulfate is neuroprotective in a reversible spinal cord ischemia model: possible involvement of GABA(A) receptors." Stroke **31**(8): 1953-6; discussion 1957.
- Laube B., Hirai H., Sturgess M., Betz H. and Kuhse J. (1997). "Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit." Neuron **18**(3): 493-503.
- Laver S., Farrow C., Turner D. and Nolan J. (2004). "Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest." Intensive Care Med **30**(11): 2126-8.
- Leal J., Luengo-Fernandez R., Gray A., Petersen S. and Rayner M. (2006). "Economic burden of cardiovascular diseases in the enlarged European Union." Eur Heart J **27**(13): 1521-2.
- Lee J. M., Zipfel G. J. and Choi D. W. (1999). "The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms." Nature **399**(6738 Suppl): A7-14.
- Lees K. R. (1998). "Does neuroprotection improve stroke outcome?" Lancet **351**(9114): 1447-8.
- Lehre K. P., Levy L. M., Ottersen O. P., Storm-Mathisen J. and Danbolt N. C. (1995). "Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations." J Neurosci **15**(3 Pt 1): 1835-53.
- Leigh P. N. and Meldrum B. S. (1996). "Excitotoxicity in ALS." Neurology **47**(6 Suppl 4): S221-7.
- Levy W. B. and Steward O. (1979). "Synapses as associative memory elements in the hippocampal formation." Brain Res **175**(2): 233-45.
- Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S. M., Ahmad M., Alnemri E. S. and Wang X. (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." Cell **91**(4): 479-89.
- Li X., Blizzard K. K., Zeng Z., DeVries A. C., Hurn P. D. and McCullough L. D. (2004). "Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender." Exp Neurol **187**(1): 94-104.
- Li Z., Zhou R., Cui S., Xie G., Cai W., Sokabe M. and Chen L. (2006). "Dehydroepiandrosterone sulfate prevents ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 by up-regulating tyrosine phosphorylation of NMDA receptor." Neuropharmacology **51**(5): 958-66.
- Liebig J. (1853). "Über Kynurensäure." Ann Chem **86**: 125-126.
- Lim C., Alexander M. P., LaFleche G., Schnyer D. M. and Verfaellie M. (2004). "The neurological and cognitive sequelae of cardiac arrest." Neurology **63**(10): 1774-8.
- Lyden P. and Wahlgren N. G. (2000). "Mechanisms of action of neuroprotectants in stroke." J Stroke Cerebrovasc Dis **9**(6 Pt 2): 9-14.
- Lyden P. D. (1999). "Thrombolysis for acute stroke." Prog Cardiovasc Dis **42**(3): 175-83.
- MacLusky N. J., Luine V. N., Hajszan T. and Leranth C. (2005). "The 17alpha and 17beta isomers of estradiol both induce rapid spine synapse formation in the CA1 hippocampal subfield of ovariectomized female rats." Endocrinology **146**(1): 287-93.
- Majewska A., Brown E., Ross J. and Yuste R. (2000). "Mechanisms of calcium decay kinetics in hippocampal spines: role of spine calcium pumps and calcium diffusion

- through the spine neck in biochemical compartmentalization." *J Neurosci* **20**(5): 1722-34.
- Majewska M. D. and Bell J. A. (1990). "Ascorbic acid protects neurons from injury induced by glutamate and NMDA." *Neuroreport* **1**(3-4): 194-6.
- Majewska M. D., Bell J. A. and London E. D. (1990). "Regulation of the NMDA receptor by redox phenomena: inhibitory role of ascorbate." *Brain Res* **537**(1-2): 328-32.
- Malinow R., Madison D. V. and Tsien R. W. (1988). "Persistent protein kinase activity underlying long-term potentiation." *Nature* **335**(6193): 820-4.
- Martinez G., Carnazza M. L., Di Giacomo C., Sorrenti V., Avitabile M. and Vanella A. (1998). "GFAP, S-100 and vimentin proteins in rat after cerebral post-ischemic reperfusion." *Int J Dev Neurosci* **16**(6): 519-26.
- Matsui T., Mori T., Tateishi N., Kagamiishi Y., Satoh S., Katsube N., Morikawa E., Morimoto T., Ikuta F. and Asano T. (2002). "Astrocytic activation and delayed infarct expansion after permanent focal ischemia in rats. Part I: enhanced astrocytic synthesis of s-100beta in the periinfarct area precedes delayed infarct expansion." *J Cereb Blood Flow Metab* **22**(6): 711-22.
- Mattson M. P., Culmsee C. and Yu Z. F. (2000). "Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke." *Cell Tissue Res* **301**(1): 173-87.
- McNaughton B. L., Douglas R. M. and Goddard G. V. (1978). "Synaptic enhancement in fascia dentata: cooperativity among coactive afferents." *Brain Res* **157**(2): 277-93.
- Miller J. M., MacGarvey U. and Beal M. F. (1992). "The effect of peripheral loading with kynurenine and probenecid on extracellular striatal kynurenic acid concentrations." *Neurosci Lett* **146**(1): 115-8.
- Montana V., Malarkey E. B., Verderio C., Matteoli M. and Parpura V. (2006). "Vesicular transmitter release from astrocytes." *Glia* **54**(7): 700-15.
- Moroni F. (1999). "Tryptophan metabolism and brain function: focus on kynurenine and other indole metabolites." *Eur J Pharmacol* **375**(1-3): 87-100.
- Moroni F., Russi P., Lombardi G., Beni M. and Carla V. (1988). "Presence of kynurenic acid in the mammalian brain." *J Neurochem* **51**(1): 177-80.
- Nelson R. M., Green A. R., Lambert D. G. and Hainsworth A. H. (2000). "On the regulation of ischaemia-induced glutamate efflux from rat cortex by GABA; in vitro studies with GABA, clomethiazole and pentobarbitone." *Br J Pharmacol* **130**(5): 1124-30.
- Nemeth H., Robotka H., Kis Z., Rozsa E., Janaky T., Somlai C., Marosi M., Farkas T., Toldi J. and Vecsei L. (2004). "Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol-induced seizures. An electrophysiological and behavioural study." *Neuropharmacology* **47**(6): 916-25.
- National Audit Office and Department of Health (2005). Reducing brain damage: Faster access to better stroke care
- Nicotera P., Leist M., Fava E., Berliocchi L. and Volbracht C. (2000). "Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death." *Brain Pathol* **10**(2): 276-82.
- Nozaki K. and Beal M. F. (1992). "Neuroprotective effects of L-kynurenine on hypoxia-ischemia and NMDA lesions in neonatal rats." *J Cereb Blood Flow Metab* **12**(3): 400-7.
- O'Dell T. J., Hawkins R. D., Kandel E. R. and Arancio O. (1991). "Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24): 11285-9.
- O'Kane R. L., Martinez-Lopez I., DeJoseph M. R., Vina J. R. and Hawkins R. A. (1999). "Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the

- blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal." J Biol Chem **274**(45): 31891-5.
- Ogawa T., Matson W. R., Beal M. F., Myers R. H., Bird E. D., Milbury P. and Saso S. (1992). "Kynurenine pathway abnormalities in Parkinson's disease." Neurology **42**(9): 1702-6.
- Ohta H., Nishikawa H., Kimura H., Anayama H. and Miyamoto M. (1997). "Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats." Neuroscience **79**(4): 1039-50.
- Oldendorf W. H. (1971). "Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection." Am J Physiol **221**(6): 1629-39.
- Peberdy M. A., Kaye W., Ornato J. P., Larkin G. L., Nadkarni V., Mancini M. E., Berg R. A., Nichol G. and Lane-Trullt T. (2003). "Cardiopulmonary resuscitation of adults in the hospital: a report of 14720 cardiac arrests from the National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation." Resuscitation **58**(3): 297-308.
- Perkins M. N. and Stone T. W. (1982). "An iontophoretic investigation of the actions of convulsant kynurenines and their interaction with the endogenous excitant quinolinic acid." Brain Res **247**(1): 184-7.
- Pulsinelli W. A. (1985). "Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics." Prog Brain Res **63**: 29-37.
- Pulsinelli W. A. and Brierley J. B. (1979). "A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat." Stroke **10**(3): 267-72.
- Pulsinelli W. A., Levy D. E. and Duffy T. E. (1982). "Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia." Ann Neurol **11**(5): 499-502.
- Pulsinelli W. A., Mann M. E., Welch K. M. A., Zivin J. A., Biller J., Maisel J., Rubin J. J., Verro P., Graham G. D., Pierce M., Kugler A. R., Mohberg N., Knapp L. E. and Poole R. M. (1999). "Fosphenytoin in acute ischemic stroke: efficacy results." Neurology **52**(2): A384.
- RANTTAS I. (1996). "A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS)." Stroke **27**(9): 1453-8.
- Robotka H., Nemeth H., Somlai C., Vecsei L. and Toldi J. (2005). "Systemically administered glucosamine-kynurenine acid, but not pure kynurenine acid, is effective in decreasing the evoked activity in area CA1 of the rat hippocampus." Eur J Pharmacol **513**(1-2): 75-80.
- Robotka H., Sas K., Agoston M., Rozsa E., Szenasi G., Gigler G., Vecsei L. and Toldi J. (2008). "Neuroprotection achieved in the ischaemic rat cortex with L-kynurenine sulphate." Life Sci **82**(17-18): 915-9.
- Rosamond W., Flegal K., Friday G., Furie K., Go A., Greenlund K., Haase N., Ho M., Howard V., Kissela B., Kittner S., Lloyd-Jones D., McDermott M., Meigs J., Moy C., Nichol G., O'Donnell C. J., Roger V., Rumsfeld J., Sorlie P., Steinberger J., Thom T., Wasserthiel-Smoller S. and Hong Y. (2007). "Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee." Circulation **115**(5): e69-171.
- Rose G. M. and Dunwiddie T. V. (1986). "Induction of hippocampal long-term potentiation using physiologically patterned stimulation." Neurosci Lett **69**(3): 244-8.
- Rossen R., Kabat H. and Anderson J. (1943). "Acute arrest of cerebral circulation." Arch Neurol Psychiatry **50**: 510-28.

- Rusakov D. A. and Kullmann D. M. (1998). "Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation." J Neurosci **18**(9): 3158-70.
- Salvati P., Ukmar G., Dho L., Rosa B., Cini M., Marconi M., Molinari A. and Post C. (1999). "Brain concentrations of kynurenic acid after a systemic neuroprotective dose in the gerbil model of global ischemia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **23**(4): 741-52.
- Sarti C., Pantoni L., Bartolini L. and Inzitari D. (2002). "Cognitive impairment and chronic cerebral hypoperfusion: what can be learned from experimental models." J Neurol Sci **203-204**: 263-6.
- Sas K., Robotka H., Rozsa E., Agoston M., Szenasi G., Gigler G., Marosi M., Kis Z., Farkas T., Vecsei L. and Toldi J. (2008). "Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus." Neurobiol Dis **32**(2): 302-8.
- Sattler R. and Tymianski M. (2001). "Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death." Mol Neurobiol **24**(1-3): 107-29.
- Sauerbeck L. R. (2006). "Primary stroke prevention." Am J Nurs **106**(11): 40-1, 43-5, 48-9; quiz 49-50.
- Saver J. L. (2006). "Time is brain--quantified." Stroke **37**(1): 263-6.
- Savtchenko L. P. and Rusakov D. A. (2004). "Glutamate escape from a tortuous synaptic cleft of the hippocampal mossy fibre synapse." Neurochem Int **45**(4): 479-84.
- Savtchenko L. P. and Rusakov D. A. (2005). "Extracellular diffusivity determines contribution of high-versus low-affinity receptors to neural signaling." Neuroimage **25**(1): 101-11.
- Schmidt-Kastner R., Paschen W., Ophoff B. G. and Hossmann K. A. (1989). "A modified four-vessel occlusion model for inducing incomplete forebrain ischemia in rats." Stroke **20**(7): 938-46.
- Schmued L. C. and Hopkins K. J. (2000a). "Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration." Brain Res **874**(2): 123-30.
- Schmued L. C. and Hopkins K. J. (2000b). "Fluoro-Jade: novel fluorochromes for detecting toxicant-induced neuronal degeneration." Toxicol Pathol **28**(1): 91-9.
- Sekhon L. H., Morgan M. K., Spence I. and Weber N. C. (1994). "Chronic cerebral hypoperfusion and impaired neuronal function in rats." Stroke **25**(5): 1022-7.
- Sekhon L. H., Morgan M. K., Spence I. and Weber N. C. (1997). "Chronic cerebral hypoperfusion: pathological and behavioral consequences." Neurosurgery **40**(3): 548-56.
- Sershen H. and Lajtha A. (1976). "Capillary transport of amino acids in the developing brain." Exp Neurol **53**(2): 465-74.
- Shors T. J. and Matzel L. D. (1997). "Long-term potentiation: what's learning got to do with it?" Behav Brain Sci **20**(4): 597-614; discussion 614-55.
- Sims N. R. and Anderson M. F. (2002). "Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke." Neurochem Int **40**(6): 511-26.
- Snape M. F., Baldwin H. A., Cross A. J. and Green A. R. (1993). "The effects of chlormethiazole and nimodipine on cortical infarct area after focal cerebral ischaemia in the rat." Neuroscience **53**(3): 837-44.
- Sorra K. E. and Harris K. M. (2000). "Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines." Hippocampus **10**(5): 501-11.

- Speciale C., Hares K., Schwarcz R. and Brookes N. (1989). "High-affinity uptake of L-kynurenine by a Na<sup>+</sup>-independent transporter of neutral amino acids in astrocytes." J Neurosci **9**(6): 2066-72.
- Stieg P. E., Sathi S., Warach S., Le D. A. and Lipton S. A. (1999). "Neuroprotection by the NMDA receptor-associated open-channel blocker memantine in a photothrombotic model of cerebral focal ischemia in neonatal rat." Eur J Pharmacol **375**(1-3): 115-20.
- Stone T. W. and Connick J. H. (1985). "Quinolinic acid and other kynurenines in the central nervous system." Neuroscience **15**(3): 597-617.
- Stone T. W. and Darlington L. G. (2002). "Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development." Nat Rev Drug Discov **1**(8): 609-20.
- Sudlow C. L. and Warlow C. P. (1997). "Comparable studies of the incidence of stroke and its pathological types: results from an international collaboration. International Stroke Incidence Collaboration." Stroke **28**(3): 491-9.
- Susin S. A., Lorenzo H. K., Zamzami N., Marzo I., Snow B. E., Brothers G. M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D. R., Aebersold R., Siderovski D. P., Penninger J. M. and Kroemer G. (1999). "Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor." Nature **397**(6718): 441-6.
- Suzuki H., Nagashima T., Tamaki N. and Yamadori T. (1998). "Cerebral ischemia affects glucose transporter kinetics across rat brain microvascular endothelium: quantitative analysis by an in situ brain perfusion method." Surg Neurol **49**(1): 67-76.
- Swartz K. J., During M. J., Freese A. and Beal M. F. (1990). "Cerebral synthesis and release of kynurenic acid: an endogenous antagonist of excitatory amino acid receptors." J Neurosci **10**(9): 2965-73.
- Sydsærf S. G., Cross A. J. and Green A. R. (1995a). "The neuroprotective effect of chlormethiazole on ischaemic neuronal damage following permanent middle cerebral artery ischaemia in the rat." Neurodegeneration **4**(3): 323-8.
- Sydsærf S. G., Cross A. J., West K. J. and Green A. R. (1995b). "The effect of chlormethiazole on neuronal damage in a model of transient focal ischaemia." Br J Pharmacol **114**(8): 1631-5.
- Teichberg V. I., Cohen-Kashi-Malina K., Cooper I. and Zlotnik A. (2009). "Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies." Neuroscience **158**(1): 301-8.
- Tsuchiya M., Sako K., Yura S. and Yonemasu Y. (1992). "Cerebral blood flow and histopathological changes following permanent bilateral carotid artery ligation in Wistar rats." Exp Brain Res **89**(1): 87-92.
- Tsuchiya M., Sako K., Yura S. and Yonemasu Y. (1993). "Local cerebral glucose utilisation following acute and chronic bilateral carotid artery ligation in Wistar rats: relation to changes in local cerebral blood flow." Exp Brain Res **95**(1): 1-7.
- Turski W. A., Nakamura M., Todd W. P., Carpenter B. K., Whetsell W. O., Jr. and Schwarcz R. (1988). "Identification and quantification of kynurenic acid in human brain tissue." Brain Res **454**(1-2): 164-9.
- van Alem A. P., de Vos R., Schmand B. and Koster R. W. (2004). "Cognitive impairment in survivors of out-of-hospital cardiac arrest." Am Heart J **148**(3): 416-21.
- Vecsei L., Miller J., MacGarvey U. and Beal M. F. (1992). "Kynurenine and probenecid inhibit pentylenetetrazol- and NMDLA-induced seizures and increase kynurenic acid concentrations in the brain." Brain Res Bull **28**(2): 233-8.

- Vesce S., Rossi D., Brambilla L. and Volterra A. (2007). "Glutamate release from astrocytes in physiological conditions and in neurodegenerative disorders characterized by neuroinflammation." *Int Rev Neurobiol* **82**: 57-71.
- Vespa P., Prins M., Ronne-Engstrom E., Caron M., Shalmon E., Hovda D. A., Martin N. A. and Becker D. P. (1998). "Increase in extracellular glutamate caused by reduced cerebral perfusion pressure and seizures after human traumatic brain injury: a microdialysis study." *J Neurosurg* **89**(6): 971-82.
- Wahlgren N. G., Ranasinha K. W., Rosolacci T., Franke C. L., van Erven P. M., Ashwood T. and Claesson L. (1999). "Clomethiazole acute stroke study (CLASS): results of a randomized, controlled trial of clomethiazole versus placebo in 1360 acute stroke patients." *Stroke* **30**(1): 21-8.
- Wang Q., Santizo R., Baughman V. L., Pelligrino D. A. and Iadecola C. (1999). "Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats." *Stroke* **30**(3): 630-7.
- Warach S., Kaufman D., Chiu D., Devlin T., Luby M., Rashid A., Clayton L., Kaste M., Lees K. R., Sacco R. and Fisher M. (2006). "Effect of the Glycine Antagonist Gavestinel on cerebral infarcts in acute stroke patients, a randomized placebo-controlled trial: The GAIN MRI Substudy." *Cerebrovasc Dis* **21**(1-2): 106-11.
- White B. C., Sullivan J. M., DeGracia D. J., O'Neil B. J., Neumar R. W., Grossman L. I., Rafols J. A. and Krause G. S. (2000). "Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury." *J Neurol Sci* **179**(S 1-2): 1-33.
- Yoshida F., Sadoshima S., Fujii K., Iino K. and Fujishima M. (1988). "Regional cerebral blood flow in chronic stroke patients with dementia." *Jpn J Med* **27**(2): 172-6.
- Yuste R. and Denk W. (1995). "Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration." *Nature* **375**(6533): 682-4.
- Zador Z., Benyo Z., Lacza Z., Hortobagyi T., Harkany T. and Hortobagyi T. (2004). "Neuroprotection in brain ischemia - doubts and hopes." *Clin Neurosci* **57**((3-4)): 81-93.
- Zha J., Harada H., Yang E., Jockel J. and Korsmeyer S. J. (1996). "Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L)." *Cell* **87**(4): 619-28.
- Zlokovic B. V. (2005). "Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration." *Trends Neurosci* **28**(4): 202-8.
- Zlotnik A., Gurevich B., Tkachov S., Maoz I., Shapira Y. and Teichberg V. I. (2007). "Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate." *Exp Neurol* **203**(1): 213-20.
- Zucker R. S. (1989). "Short-term synaptic plasticity." *Annu Rev Neurosci* **12**: 13-31.



## Tudományos közlemények jegyzéke:

### Cikk:

***Cellular and molecular neurobiology (2009) in press (Impakt faktor: 2.483)***

Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischemia in the rat cortex

Nagy D, Marosi M, Kis Z, Farkas T, Rakos G, Vecsei L, Teichberg VI, Toldi J.

***European Journal of Pharmacology 604 (2009) 51-57 (Impakt faktor: 2.376)***

*Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion*

Máté Marosi; János Fuzik; Dávid Nagy; Gabriella Rákos; Zsolt Kis; József Toldi; Vivian I Teichberg; Angela Ruban-Matuzani; Tamás Farkas

***Neurobiology of Disease 32, (2008) 302-308. (Impakt faktor: 4.377 )***

*Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus*

Sas, K., Robotka, H., Rozsa, E., Agoston, M., Szénási, G., Gigler, G., Marosi, M., Kis, Z., Farkas, T., Vecsei, L., Toldi, J.

***Journal of Neuroscience Methods 156 (2006) 231–235 (Impakt faktor: 1.894)***

*Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia*

Marosi M, Rakod G, Robotka H, Nemeth H, Sas K, Kis Zs, Farkas T, Lür Gy, Vecsei L, Toldi J

***Neuropharmacology 47 (2004) 916–925 (Impakt faktor: 3.734) (Társszerző)***

*Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol-induced seizures. An electrophysiological and behavioural study*

Nemeth H, Robotka H, Kis Z, Rozsa E, Janaky T, Somlai C, Marosi M, Farkas T, Toldi J, Vecsei L.

### **Idézhető konferencia absztraktok:**

***European Journal of Neurology 15 (2008) 77-77***

*L-kynurenine sulfate rescues the ischaemia-induced deficit in the rat hippocampal CA1 neurons. A complex histological and electrophysiological study*

Sas K; Robotka H; Rózsa É; Ágoston M; Szénási G; Gigler G; Marosi M; Kis Zs; Farkas T; Vecsei L; Toldi J

***Journal of Neuronal Transmission 115 (2008) 1482-1482***

*Kynurenine treatment restores the ischaemia induced impairment of long-term potentiation in the rat hippocampus*

Sas K; Robotka H; Rózsa É; Ágoston M; Szénási G; Gigler G; Marosi M; Kis Zs; Farkas T; Ungurean A; Vecsei L; Toldi J

***Ideggyógyászati szemle (Clinincal neuroscience) 2007;60(S1):43***

*Electrophysiological study of peptides effective against the synaptotoxicity induced by beta-amyloid peptide*

M. Marosi, T. Farkas, Zs. Kis, K. Soós, L. Fülöp, B. Penke and J. Toldi

**Poszter:**

***6<sup>th</sup> International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology***

*Oxaloacetate restores the long-term potentiation impaired in rat hippocampus CA1 region by 2-vessel occlusion*

Marosi M., Fuzik J., Nagy D., Rákos G., Kis Z., Farkas T., Teichberg V.I. and Toldi J.

*Oxaloacetate decreases the infarct size and attenuates the reduction in evoked responses after photothrombotic focal ischaemia in rat cortex*

D. Nagy, M. Marosi, Zs. Kis, T. Farkas, G. Rakos, L. Vecsei, V.I. Teichberg, J. Toldi

***IBRO International Workshop on Complex Neuronal Networks ( 2008)***

*Oxaloacetate is efficient in recovering ischemia-induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal CA1 region*

Marosi M., Fuzik J, Nagy D, Rákos G, Kis Z, Farkas T and Toldi J

***7<sup>th</sup> Meeting of the German Neuroscience Society - 31<sup>st</sup> Göttingen Neurobiology Conference (2007)***

*Neuroprotective effects of repeated transient global ischemia and of kynurenine administration induced by four-vessel occlusions on hippocampal CA1 neurons*

József Toldi, Hermina Robotka, Tamás Kopcsányi, Katalin Sas, Gabriella Rákos, Zsolt Kis, Tamás Farkas, Máté Marosi, László Vécsei, Eniko Racekova and Jozef Burda

***A Magyar Idegtudományi Társaság 12. Kongresszusa (2007)***

*Electrophysiological study of peptides effective against the synaptotoxicity induced by beta-amyloid peptide*

M. Marosi, T. Farkas, Zs. Kis, K. Soós, L. Fülöp, B. Penke and J. Toldi  
***Ideggyógyászati szemle (Clinincal neuroscience) 2007;60(S1):43***

***5<sup>th</sup> Forum of European Neuroscience ( 2006)***

*Dissections of cervical arteries – Lesions from analysis of 4 cases.*

K. Sas, L. Sztriha, E. Vörös, H. Robotka, M. Marosi, J. Toldi, L. Vécsei

*Neuroprotective effects of repeated transient global ischemia induced by four-vessel occlusions on hippocampal CA1 neurons.*

Robotka H., Burda J., Sas K., Racekova E., Rákos G., Kis Zs ., Farkas T., Marosi M., Vécsei L. & Toldi J.

*Hippocampal (CA1) activities in Wistar rats from different vendors. Fundamental differences in acute ischemia.*

Máté Marosi, Gabriella Rákos, Hermina Robotka, Hajnalka Németh, Katalin Sas, Dávid Nagy, György Lür, Zsolt Kis, Farkas Tamás, László Vécsei and József Toldi

***Magyar Élettani Társaság LXX. Vándorgyűlése (2006)***

***Oxálecetsav hatása a szomatoszenzoros és mozgató kérgi kiváltott válaszokra***

Nagy Dávid, Lür György, Marosi Máté, Vivian I. Teichberg, Toldi József

***IBRO Regulatory mechanisms of synaptic transmission in the central nervous system ( 2005)***

*Fundamental differences in the acute but not in chronic ischemic tolerance of hippocampal CA1 region between wistar rats from different vendors*

Máté Marosi, Gabriella Rákos, Hermina Robotka, Hajnalka Németh, Katalin Sas, Dávid Nagy, György Lür, Zsolt Kis, Farkas Tamás, László Vécsei and József Toldi

*Effects of dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) on the evoked cortical activity of controls and of brain-injured rats*

Lür, György; Rákos, Gabriella; Marosi, Máté; Nagy, Dávid; Farkas, Tamás; Kis, Zsolt; Toldi, József

***A Magyar Idegtudományi Társaság 11. Kongresszusa (2005)***

*Systemically administered glucosamine-kynurenic acid, but not pure kynurenic acid, is effective in decreasing the evoked activity in area CA1 of the rat hippocampus*

Robotka Hermina, Marosi Máté, Németh Hajnalka, Lür György, Somlai Csaba, Toldi József, Vécsei László

*Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol -induced seizures. An electrophysiological and behavioural study*

Hermina Robotka, Máté Marosi, Hajnalka Németh, Zsolt Kis, Tamás Farkas, József Toldi and László Vécsei

***IBRO International Workshop on Neuronal Circuits (2004):***

*Kynurenine administered together with probenecid markedly inhibits pentylenetetrazol - induced seizures. An electrophysiological and behavioural study*

Hermina Robotka, Máté Marosi, Hajnalka Németh, Zsolt Kis, Tamás Farkas, József Toldi and László Vécsei

## **Mellékletek:**